



# Implementação de *Dry Soak* em Rolhas de Cortiça

**Diogo José Amaral de Oliveira**

Mestrado em Química

Departamento Química e Bioquímica, Faculdade  
de Ciências, Universidade do Porto  
2016

## **Orientador**

Paulo Almeida, Professor Auxiliar, Faculdade  
de Ciências, Universidade do Porto

## **Orientador (Empresa)**

João Vasco Almeida, Direção da Qualidade,  
Laboratório de Rolhas Naturais, Amorim & Irmãos





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar, a oportunidade que a Amorim & Irmãos S.A me deu, em poder estagiar numa empresa na qual obtive uma desenvoltura pessoal e profissional e me permitiu estagiar com colaboradores de excelência, me ofereceu uma visão mais alargada do mercado de trabalho e visão para desenvolver novos projetos no amanhã.

A minha palavra de agradecimento ao Dr. João Vasco Almeida, Diretor da Qualidade Amorim & Irmãos, com quem pude crescer e aperfeiçoar as minhas competências e até desenvolver novas, como a análise sensorial. Penso que para além de orientador, foi um mentor, com quem pude tirar dúvidas e melhorar a minha performance como profissional.

Agradeço ao Engenheiro Hélder Silva, Chefe do Laboratório de Rolhas Naturais, com quem pude trocar ideias e esclarecer dúvidas e enriquecer o meu trabalho.

A minha palavra de agradecimento às analistas, que para além de me ajudarem todos os dias no terreno, fizeram-me sentir um colaborador, não um estagiário! Obrigado Alzira Soares (mãe número 35), Ana Leandro (companheira do sensorial), Laurinda Pinto (pela sua calma e paciência), Maria José (pela ajuda na aprendizagem de escolha rolhas) e a Paula Gomes (pelas palavras de incentivo e força).

Expresso desde já, a minha gratidão aos estagiários da Amorim & Irmãos, Andreia, Catarina, Daniel, Eduardo, José, Ricardo e Sara pela força, períodos de almoço animados que ocorriam durante os 5 dias de estágio.

Agradeço também ao meu orientador FCUP, Dr. Paulo Almeida, pelo incentivo e dedicação na orientação do meu trabalho ao longo destes 9 meses.

No campo familiar, agradeço à estrela que brilha com mais intensidade no céu, a minha mãe, devido aos valores que me transmitiu no seu período de vida comigo.

Agradeço também, à minha irmã, cunhado e afilhada, pela força e por todos os dias me acolherem em sua casa e se preocuparem comigo como se fosse um filho.

Quanto a amigos chegados, agradeço ao Zé, pelo carinho, força, incentivo e me fazer acreditar que seria capaz de ir mais longe. Agradeço também à Cris, pela força e incentivo e aos meus restantes amigos e colegas, pela força, incentivo e preocupação demonstrados.

## RESUMO

Este estágio na empresa Amorim & Irmãos S.A. tem como objetivo principal a implementação do método de análise sensorial *Dry Soak* em rolhas de cortiça, nas diferentes unidades industriais do grupo Amorim, procurando correlacionar os resultados da análise sensorial por *Dry Soak* com a convencional com a concentração de TCA.

No laboratório da empresa, efetuam-se os mais variados ensaios que garantem a conformidade das rolhas naturais e colmatadas da Unidade Industrial de Santa Maria de Lamas. A humidade, a densidade, a massa, o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), as partículas, o 2,4,6- triclóroanisol (TCA, conhecido por estar associado ao “gosto a rolha” no vinho) são alguns exemplos de ensaios analíticos efetuados.

A análise sensorial é importante para a deteção de odores por via olfativa, através da maceração de uma rolha em solução hidroalcoólica a 12%, água ou mesmo vinho. Segundo a norma ISO 22308, os odores diferenciam-se como odores químicos, vegetais, terrosos, bolores/mofos (nos quais se enquadra o TCA) e decomposição. Este método envolve uma amostra de 80 ou 100 rolhas de um lote, analisadas individualmente. Todavia, este método tem vários fatores desfavoráveis, uma vez que a amostra não pode ser reutilizada e enviada para o cliente e é moroso. Deste modo, surgiu a análise sensorial por *Dry Soak* que permite a deteção sensorial de aromas, incluindo o TCA, sem inutilização da rolha e assegurando a ausência de aromas, em lotes pequenos (até 10 000 rolhas).

Como complemento ao trabalho, testou-se e validou-se o método de Super ROSA, na Unidade Industrial. O método ROSA (*Rate of Optimal Steam Application*) é uma referência na diminuição de TCA por utilização de uma corrente de vapor de água, arrastando consigo componentes voláteis como o TCA. O método Super ROSA é uma otimização do ROSA. Neste trabalho, utilizou-se também o etanol em diferentes concentrações, bem como 2-propanol, pela afinidade que a molécula de TCA apresenta para grupos OH.

Em suma, com este trabalho procura-se contribuir para a garantia de qualidade das rolhas naturais e colmatadas da unidade Amorim & Irmãos S.A bem como a otimização de processos de remoção de compostos voláteis.<sup>[1]</sup>

## ABSTRACT

This stage in Amorim & Irmãos S.A. has as main objective the implementation of sensory analysis method Dry Soak cork stoppers in different industrial units of the Amorim group, to correlate the results of sensory analysis with the content of TCA.

In the company's laboratory, perform the various tests that guarantee the excellence of natural cork stoppers in Industrial Unit of Santa Maria de Lamas. Humidity, density, mass, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), particulate matter, 2,4,6-trichloroanisole (TCA, known to be associated with cork taint in wine) are some examples of analytical tests performed.

The sensory analysis is important for detection of odors through touchable by macerating a stopper in hydroalcoholic solution 12%, water or wine. According to the ISO 22308 standard, odors differ as chemical odors, plant, earth, mold (in which fits TCA) and decomposition. This method involves a sample of 80 or stoppers 100 of a batch are analyzed individually. However, this method has various unfavorable factors, since the sample can not be reused and sent to the client, does not guarantee the batch is decontaminated malodors and is time consuming. Thus came the sensory analysis Dry Soak that allows sensory detection of smells, including the TCA, without destruction of the cork and ensuring the absence of aromas in small lots (up to 10,000 corks).

As a complement to work, we tested and validated to the Super ROSA method in the UI. SUPER ROSA method (Rate Optimal of Steam Application) is a reference in decreased TCA by using a water vapor stream, dragging volatile components such as TCA. Super ROSA method is a ROSA optimization. In this work, it is also used in different concentrations ethanol and 2-propanol, the affinity molecule TCA has to OH groups.

In short, this work seeks to contribute to ensuring the quality of natural corks in Amorim S.A unit as well as the optimization of removal of volatiles processes. <sup>[1]</sup>

## **Siglas e Abreviaturas**

**AI** – Amorim & Irmãos

**AD** – Amorim Distribuição

**CHK** - ChampCork

**TS** - Top Series

**VL** - Vasconcelos e Lyncke

**PTK** - Porto Cork

**DS** - De Sousa

**EQP** - Equipar

**I&D** – Instituto de Investigação e Desenvolvimento

**UI** – Unidade Industrial

# ÍNDICE

## Conteúdo

AGRADECIMENTOS.....	2
RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	4
Siglas e Abreviaturas .....	5
ÍNDICE .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABELAS .....	9
1.1 Apresentação da empresa Amorim & Irmãos, S.A. ....	10
1.2 OBJETIVOS DO ESTÁGIO.....	14
2 AS ROLHAS DE CORTIÇA E O 2,4,6 - TRICLOROANISOL.....	15
2.1 A Cortiça .....	15
2.2 Estrutura Celular e Propriedades Físicas da Cortiça .....	16
2.2.1 Propriedades Físicas e Mecânicas .....	17
2.3 Estrutura Química da Cortiça .....	17
2.3.1 Suberina .....	18
2.3.2 Lenhina.....	19
2.3.3 Polissacarídeos (Celulose e Hemicelulose).....	21
2.3.4 Extratáveis.....	21
2.3.5 Outros Componentes.....	22
2.4 Processo de Preparação e Produção de Rolhas .....	22
2.5 Breve Menção aos Contaminantes Existentes na Rolha .....	24
2.6 Mecanismos da Formação dos Cloroanisóis .....	26
2.7 Métodos Sensoriais e Analíticos de Detecção de TCA .....	29
2.7.1 Análise Sensorial .....	29
2.7.2 Técnicas Utilizadas na Quantificação de TCA.....	31
2.8 Métodos de Remoção de TCA nas Rolhas de Cortiça.....	36
3 TRABALHO DE ESTÁGIO.....	39
3.1 Análise Físico-Mecânica ( MEDCORK) .....	39
3.2 Análise Visual .....	39
3.3 Preparação dos Soaks.....	40
3.4 Controlo de Oxidantes .....	40
3.5 Análise de Particulados e Capilaridade .....	40

3.6	Estudo da Migração de Taninos .....	41
3.7	Análise Sensorial .....	41
4	ESTUDOS E RESULTADOS OBTIDOS .....	42
4.1	Estudo da concentração mínima de TCA percecionada pelo método de análise sensorial tradicional para rolhas de cortiça com diferentes lavações.....	43
4.2	Controlo do método de análise sensorial tradicional por comparação com o método da análise cromatográfica.....	48
4.2.1	Rolhas de Cortiça Classificadas como Nível 1 por análise sensorial tradicional.....	49
4.2.2	Rolhas de Cortiça classificadas como Nível 2 por análise sensorial tradicional.....	50
4.2.3	Rolhas de Cortiça Classificadas como Nível 3 por análise sensorial tradicional.....	51
4.2.4	Rolhas de Cortiça Classificadas como Nível 4 por análise sensorial tradicional.....	53
4.2.5	Falsos positivos e classificações sensoriais incorretas .....	54
4.3	Avaliação do Método <i>Dry Soak</i> .....	56
4.3.1	Ensaio sensorial por <i>Dry Soak</i> e Implementação nas diferentes UI's .....	56
4.3.2	Carta de Controlo para o método <i>Dry Soak</i> .....	59
4.3.3	Falsos Positivos .....	61
4.4	Avaliação do processo Super Rosa por <i>Dry Soak</i> .....	62
4.5	Estudos da percentagem de Humidade nas amostras de rolhas após Super Rosa .....	67
4.6	Otimização do método Super Rosa utilizando diferentes solventes .....	69
5	CONCLUSÃO.....	73
6	BIBLIOGRAFIA .....	77



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Diagrama estrutural da empresa Corticeira Amorim SGPS, SA. <sup>[1]</sup> .....	10
<b>Figura 2</b> - Gama de rolhas Amorim & Irmãos S.A. <sup>[1]</sup> .....	13
<b>Figura 3</b> - Estrutura celular da cortiça por SEM <sup>[2]</sup> .....	16
<b>Figura 4</b> - Gráfico circular da constituição química da cortiça <sup>[11]</sup> .....	18
<b>Figura 5</b> - Estrutura modelo da suberina. <sup>[14]</sup> .....	19
<b>Figura 6</b> - Figura esquemática de uma célula polimérica de lenhina <sup>[16]</sup> .....	20
<b>Figura 7</b> - Monómeros álcoois aromáticos p- coumarílico, coniferílico e sinapílico ....	20
<b>Figura 8</b> - Representação Química da Celulose <sup>[17]</sup> .....	21
<b>Figura 9</b> - Halofenóis e Haloanisóis mais detetados em rolhas de cortiça <sup>[22]</sup> .....	25
<b>Figura 10</b> - Diferentes mecanismos de formação de TCA <sup>[25]</sup> .....	28
<b>Figura 11</b> - Roda de Aromas sensoriais de cortiça <sup>[26]</sup> .....	30
<b>Figura 12</b> - Estrutura esquemática de ECD <sup>[31]</sup> .....	34
<b>Figura 13</b> - Constituição interna de um equipamento de GC/MS <sup>[33]</sup> .....	35
<b>Figura 14</b> - Esquema do processo ROSA <sup>[37]</sup> .....	37
<b>Figura 15</b> - Preparação de uma amostra de rolhas para análise sensorial tradicional....	43
<b>Figura 16</b> – Carta de controlo da concentração de TCA (ng/L) obtida por análise cromatográfica em função do número de amostra classificada por análise sensorial como nível 1 (duvidoso) .....	49
<b>Figura 17</b> - Carta de controlo da concentração de TCA (ng/L) obtida por análise cromatográfica em função da amostra classificada por análise sensorial como nível 2 (TCA ligeiro).....	50
<b>Figura 18</b> – Carta de controlo representando a concentração de TCA (ng/L) obtida por análise cromatográfica em função da amostra classificada por análise sensorial como nível 3 (moderado).....	52
<b>Figura 19</b> - Carta de controlo representando a concentração de TCA (ng/L), obtida por análise cromatográfica, em função da amostra classificada por análise sensorial como nível 4 (forte).....	53
<b>Figura 20</b> - Percentagem de falsos positivos na análise sensorial dentro de cada nível sensorial.....	55
<b>Figura 21</b> - Dry Soak Individual.....	57
<b>Figura 22</b> - Dry Soak Coletivo .....	57
<b>Figura 23</b> – Carta de Controlo que representa a concentração de TCA (ng/L) em função da amostra a analisar. Para o estudo, utilizaram-se 20 rolhas positivas em TCA por análise sensorial.....	60
<b>Figura 24</b> - Gráfico de barras que representa a percentagem de amostras com TCA detetável e TCA considerado Falso positivo para o método Dry Soak (1) e Análise Sensorial Tradicional (2).....	61
<b>Figura 25</b> - Equipamento MedCork.....	68
<b>Figura 26</b> – Estudo da Percentagem de Humidade obtida para as amostras numeradas de 10 a 16 após processo Super Rosa .....	68
<b>Figura 27</b> – Resultados do Processo Super Rosa utilizando H <sub>2</sub> O.....	70
<b>Figura 28</b> - Resultados do Processo Super Rosa utilizando solução hidroalcoólica a 12 % .....	71

## ÍNDICE DE TABELAS

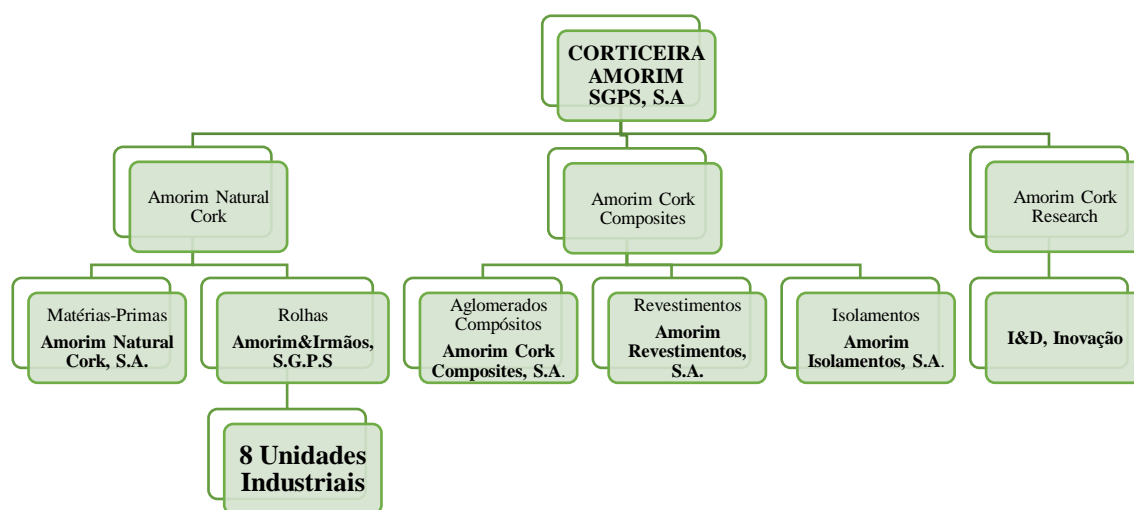
<b>Tabela 1-</b> Unidades Industriais Amorim & Irmãos S.A. <sup>[1]</sup> .....	11
<b>Tabela 2</b> - Gama de rolhas da Amorim & Irmãos S.A. <sup>[1]</sup> .....	12
<b>Tabela 3</b> Principais odores encontrados em análise sensorial segundo a norma ISO 22308 <sup>[26]</sup> .....	30
<b>Tabela 4</b> Limites de perceção para os mais anisóis encontrados na análise sensorial <sup>[26]</sup> .....	31
<b>Tabela 5</b> Estudo da concentração mínima de TCA percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação CI0, através de análise cromatográfica .....	44
<b>Tabela 6</b> Estudo da concentração mínima de TCA percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação Nova101, através de análise cromatográfica .....	45
<b>Tabela 7</b> Estudo da concentração mínima percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação Light através de análise cromatográfica .....	46
<b>Tabela 8</b> Estudo da concentração mínima percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação CI2000C, através de análise cromatográfica .....	47
<b>Tabela 9</b> Estudo da concentração mínima percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação Nature através de análise cromatográfica .....	48
<b>Tabela 10</b> Número de Rolhas por frasco para rolhas de diferentes calibres .....	57
<b>Tabela 11</b> Resultados obtidos no decorrer da análise sensorial por Dry Soak, bem como os resultados cromatográficos dos positivos obtidos no decorrer da análise sensorial...	58
<b>Tabela 12</b> Resultados de TCA, obtidos por análise cromatográfica para rolhas classificadas através de análise sensorial, método tradicional, como positivo de TCA. 58	
<b>Tabela 13</b> Resultados Sensoriais e Cromatográficos de rolhas contaminadas antes do processo Super Rosa .....	63
<b>Tabela 14</b> Resultados da análise Sensorial e Cromatográfica de rolhas contaminadas após o processo Super Rosa .....	65

# I - INTRODUÇÃO

## 1.1 Apresentação da empresa Amorim & Irmãos, S.A.

A empresa Amorim & Irmãos, localizada no concelho de Santa Maria da Feira, foi fundada no ano de 1820 e pertence ao Grupo Corticeira Amorim SGPS, S.A. O grupo é uma das maiores empresas portuguesas com grande relevo internacional. De destacar, operações em dezenas de países nos diferentes continentes.

A Corticeira Amorim, organiza-se em cinco unidades de negócio designadamente, matérias-primas, rolhas, revestimentos, aglomerados, compósitos e isolamentos, conforme se pode observar na Figura 1. Das diferentes unidades, surgem as mais variadas aplicações sendo considerada a de maior valor acrescentado para o grupo, a produção de rolhas para a indústria vinícola. Todavia, produtos “high-tech” como por exemplo, aplicações aeronáuticas, revestimentos e produtos na área da construção, são também de grande relevo no mercado interno e externo.<sup>[1]</sup>



**Figura 1** - Diagrama estrutural da empresa Corticeira Amorim SGPS, SA. <sup>[1]</sup>

No decorrer dos anos, Amorim & Irmãos expandiu-se, estruturando-se em oito unidades industriais, com diferentes especializações, conforme se pode observar na Tabela 1.

A Amorim & Irmãos - Unidade de Negócios de Rolhas da Corticeira Amorim SGPS é considerado o maior produtor e fornecedor de rolhas de cortiça no mercado mundial, produzindo anualmente mais de quatro mil milhões de unidades, apresentando cerca de 35% de quota do mercado corticeiro global. Deste modo, subsidiárias da Amorim & Irmãos nos locais com maior produção vinícola (*Sales Companies*), como África do Sul, Austrália, América e Europa foram criadas, de modo a conferir vantagens de relação direta com os principais produtores de vinho.<sup>[1]</sup>

**Tabela 1-** Unidades Industriais Amorim & Irmãos S.A.<sup>[1]</sup>

Amorim & Irmãos S.A.	
Unidade Industrial (UI)	Atividades
• <b>AI</b>	Produção de Rolhas Naturais e Colmatadas
• <b>AD</b>	Marcação e tratamento de Rolhas Naturais, Colmatadas, Aglomeradas, Twin Top®, Neutrocork®, Acquamark® e Advantec®
• <b>CHK</b>	Produção, Marcação e Tratamento de Rolhas de Champanhe e Aglomeradas
• <b>TS</b>	Produção de Rolhas Capsuladas e Especialidades
• <b>VL</b>	Tratamento e escolha de Rolhas Naturais e Colmatadas
• <b>PTK</b>	Marcação, Tratamento, Escolha e Lavagem de Rolhas Naturais
• <b>DS</b>	Produção de Rolhas Neutrocork® e Helix®
• <b>EQP</b>	Produção, Marcação e Tratamento de Rolhas Twin Top®, Advantec® e Aglomeradas.

No presente, uma vasta gama de rolhas é produzida de acordo com as especificidades da empresa, destaca-se o calibre, classe e processo de tratamento.

Na Tabela 2 encontram-se as aplicações de cada rolha, bem como as suas diferentes vantagens.<sup>[1]</sup>

**Tabela 2** - Gama de rolhas da Amorim & Irmãos S.A. <sup>[1]</sup>

Rolha	Vantagens e Aplicações
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Natural</b></li> </ul> <p>Rolha tradicional obtida a partir da casca de sobreiro</p>	Rolha de origem natural, topo de gama, para vinhos tranquilos de elevada qualidade e de longo estágio de engarrafamento.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Acquamark®</b></li> </ul> <p>Rolha natural revestida por uma solução de base aquosa</p>	Rolha de grande capacidade de vedação do vinho, para além de ser ecologicamente sustentável – Reciclável, Biodegradável e Ecológica.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Spark®</b></li> </ul> <p>Rolha constituída por aglomerado de cortiça e dois discos de cortiça natural</p>	Rolha utilizada nos melhores champanhes e espumantes cujas vantagens são as mais variadas pelo seu grande controlo bem como a sua facilidade de engarrafamento assim como o seu comportamento mecânico de elite.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Twin-Top®</b></li> </ul> <p>Rolha técnica constituída por dois discos de cortiça natural em ambos os topos numa rolha aglomerada</p>	Rolha ideal para vinhos frutados de curto período de estágio na garrafa, contendo todos os benefícios da rolha de cortiça natural no que diz respeito à sua sustentabilidade.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rolha Neutrocork®</b></li> </ul> <p>Rolha técnica de cortiça natural resultante da compactação de micro grânulos de cortiça de distribuição uniforme</p>	Rolha recomendada para vinhos complexos e de rápido consumo (período ideal de dois anos) fruto de grande desenvolvimento de tecnologia de ponta.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rolha Advantec®</b></li> </ul> <p>Rolha técnica prestigiada pelas medidas anti-TCA</p>	Rolha utilizada para vinhos de elevada rotação com características sensoriais e técnicas de última geração aliada a um preço e performance irrefutáveis no mercado de vedantes.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rolha Aglomerada®</b></li> </ul> <p>Rolha constituída por material granulado de cortiça de tamanhos - 2-3 mm (aglomerado RA) ou 3-7 mm (RCT).</p>	Rolha cuja aplicação se destina a vinhos de consumo rápido. Solução económica e de performance bastante eficiente.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Helix®</b></li> </ul> <p>Rolha ergonómica de qualidade e design inovadores aliados ao sentido prático dos consumidores na abertura da garrafa.</p>	Rolha de grande capacidade vedante garante a preservação do sabor bem como benefícios ambientais no que diz respeito a vidro e cortiça numa solução funcional sem utilização de um saca-rolhas.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Top-Series®</b></li> </ul> <p>Rolhas de cortiça capsuladas de alta gama da <i>Amorim Luxury Unit</i></p>	Dependendo dos materiais constituintes da cápsula pode-se dividir top-series em quatro categorias: <u>Prestige</u> : Materiais inovadores luxuosos de design inovador; <u>Elegance</u> : Materiais cerâmicos, compósitos e metais. <u>Premium</u> : Rolhas personalizadas com logótipos ou relevos; <u>Classic Value</u> : Rolhas de diferentes colorações e moldagens.

A Amorim & Irmãos produz o mais variado tipo de rolhas que não são de uso exclusivo para vinhos, são exemplos bebidas como a cerveja, champanhe e licores. Deste modo, a empresa preza pela qualidade e excelência dos seus produtos nos mais variados mercados. Na [figura 2](#) pode-se observar as mais variadas rolhas para os mais diferentes mercados de produção de bebidas. <sup>[1]</sup>



**Figura 2** - Gama de rolhas Amorim & Irmãos S.A. <sup>[1]</sup>

Por conseguinte, a variedade e qualidade das rolhas da Amorim & Irmãos S.A. procede de um vasto controlo desde a origem até ao produto acabado, sendo que a origem é um fator que deve ser tomado em consideração num na produção de rolhas de qualidade.

## 1.2 OBJETIVOS DO ESTÁGIO

- 1) Treino de análise sensorial tradicional e análise sensorial por *Dry Soak*;
- 2) Análise da concentração mínima de TCA percecionada para as mais variadas lavagens de rolhas;
- 3) Controlo da análise sensorial método tradicional, através de ferramentas de qualidade, como cartas de controlo;
- 4) Controlo da análise sensorial *Dry Soak*, através de ferramentas de qualidade, como cartas de controlo;
- 5) Implementação de *Dry Soak* nas diferentes UI's;
- 6) Avaliação do método Super Rosa por *Dry Soak*;
- 7) Otimização do método Super Rosa, utilizando diferentes agentes de remoção de TCA;

## 2 AS ROLHAS DE CORTIÇA E O 2,4,6 - TRICLOROANISOL

### 2.1 A Cortiça

Nos dias de hoje, nas diferentes organizações de cortiça, a preocupação ambiental com recursos sustentáveis, renováveis e naturais, tem sido uma constante e uma mais-valia como fundamento numa empresa. No que diz respeito à cortiça, considera-se matéria-prima que cumpre estes requisitos. <sup>[2]</sup>

A cortiça é produzida através da extração da casca de sobreiro (*Quercus suber L.*), cuja localização se situa ao longo da bacia Mediterrânica (Portugal, Espanha, Sul de França, Sul de Itália e Norte de África). De realçar que Portugal, é o maior produtor de cortiça, sendo responsável por cerca de 75% da produção deste produto. <sup>[2,3]</sup>

A espécie *Quercus suber L.*, tem um tempo de vida situado entre 170 a 200 anos, sendo o primeiro descortiçamento realizado após 25 anos da sua plantação, pelo que os descortiçamentos seguintes, efetuam-se de 9 em 9 anos ou 12 em 12 dependendo da região de cultivo, dado que dependendo da qualidade da cortiça, a mesma pode obter as mais variadas aplicações. <sup>[3]</sup>

As aplicações da cortiça são as mais variadas. De realçar a produção de rolhas para engarrafamento de vinhos. Contudo, a cortiça também pode ser utilizada como compósitos e até revestimentos. Sendo que, sua qualidade e espessura depende das condições de crescimento da árvore. <sup>[4]</sup>

A cortiça pode-se dividir em três classes fundamentais, a cortiça Virgem, a Segundeira e a Amadia. Num estado inicial, tem-se a denominada **Cortiça Virgem**, correspondente às primeiras células de cortiça formadas após o primeiro descortiçamento em sobreiros com 25 anos de idade. O interesse económico desta cortiça é reduzido, sendo utilizada essencialmente para trituração e aglomerados, uma vez que apresenta sulcos profundos.

De seguida, passam-se 9 anos até se poder retirar novamente a cortiça do sobreiro, sendo classificada como **Cortiça Secundeira**. Tanto a cortiça virgem como a secundeira,

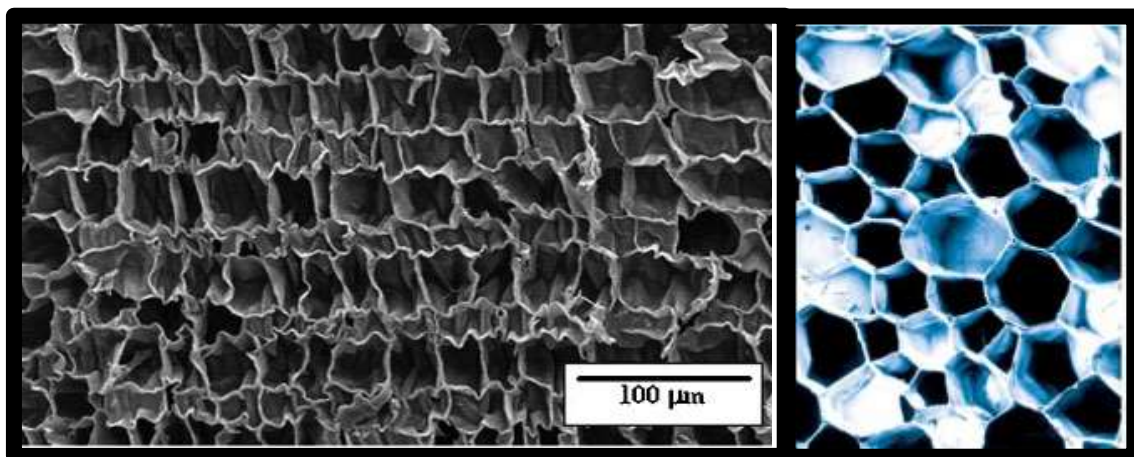


têm uma estrutura demasiado irregular pelo que a aplicação se destina a material triturado e aglomerado.

Após 18 anos do primeiro descortiçamento, surge a **Cortiça da Amadia**, que corresponde a um material com propriedades mecânicas e físicas que garante a qualidade de excelência das rolhas naturais, sendo rolhas com elevado potencial económico para indústria corticeira. <sup>[5]</sup>

## 2.2 Estrutura Celular e Propriedades Físicas da Cortiça

A estrutura celular da cortiça foi obtida pela primeira vez em 1987, por Hooke, através de SEM (Microscopia Eletrónica de Varrimento). Na Figura 3 pode-se observar uma textura homogénea, compacta, regular e sem espaçamentos. <sup>[6]</sup>



**Figura 3** - Estrutura celular da cortiça por SEM <sup>[2]</sup>

Esta estrutura, confere a um material como a cortiça, as mais variadas propriedades físicas e mecânicas.

### 2.2.1 Propriedades Físicas e Mecânicas

As propriedades físicas de cortiça advêm da sua estrutura celular única e da composição química das paredes e membranas celulares. Algumas das características da cortiça são um importante fator para a valorização deste material. De destaque, a sua capacidade como **Isolante Térmico e Sonoro**, pelo facto do ar aprisionado no interior das células regenerar muito lentamente e pela grande quantidade de ar contido e sua falta de movimento, fazem com que a cortiça seja um excelente isolante. <sup>[2]</sup>

A sua **Elasticidade e Compressibilidade** adquirida a partir da flexibilidade das membranas, juntamente com o ar aprisionado, fazem com que recupere a sua forma original após a compressão. De realçar também a sua excelente capacidade de **Resistência à Água**, pela presença de suberina na cortiça, que garante a resistência à água e a ausência quase total de capilaridade. Quanto à sua massa, considera-se um material leve, pelo que a sua **Leveza** já conhecida desde os tempos remotos, permite aplicações como material flutuante no fabrico de boias, devido à sua baixa densidade, e espaçamento intrínseco a líquidos como água. Mecanicamente, apresenta uma **Resistência ao Desgaste** através da resistência à abrasão devida à estrutura em favo de mel e elasticidade das membranas. <sup>[8]</sup>

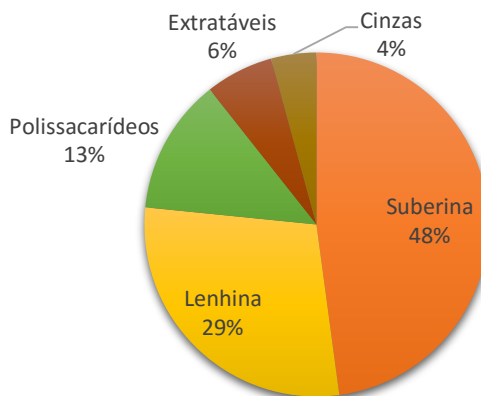
E por fim, destaca-se a sua **Durabilidade**, por considerar-se um material muito resistente e com uma elevada durabilidade, tem a capacidade para reter as suas propriedades originais inalteradas. A sua elevada concentração de taninos polifenólicos torna-a praticamente imputrescível. <sup>[2;8]</sup>

### 2.3 Estrutura Química da Cortiça

A composição química da cortiça tem sido estudada desde o século XVIII por químicos <sup>[9]</sup>. Deste material, Chevreul <sup>[10]</sup> foi o primeiro investigador na área, que descobriu qual o constituinte fundamental da cortiça, tendo chegado à conclusão que a suberina é um dos elementos fundamentais, assim como o constituinte que explica algumas propriedades. <sup>[10,11]</sup>

Ao longo do tempo, realizaram-se mais trabalhos na área, tendo-se detetado componentes como lenhina, polissacarídeos e componentes extratáveis. No gráfico da

Figura 4, pode-se observar os diferentes constituintes químicos e a sua proporção na cortiça.



**Figura 4** - Gráfico circular da constituição química da cortiça <sup>[11]</sup>

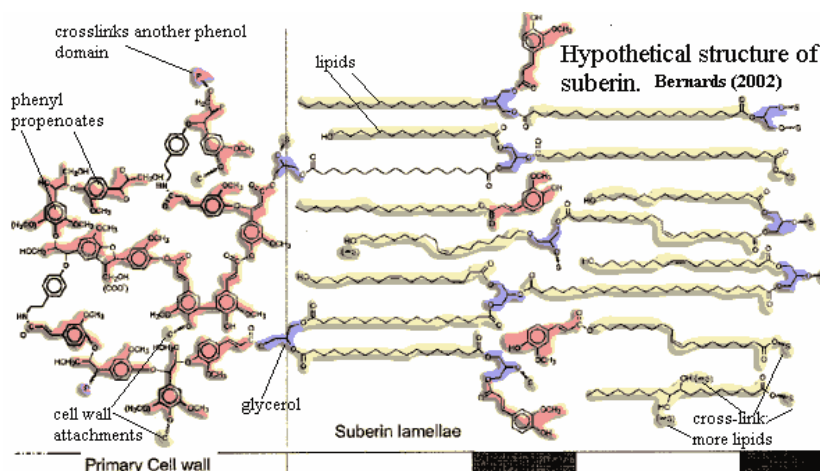
### 2.3.1 Suberina

A suberina tem obtido uma grande atenção por parte da investigação nesta área por se considerar o principal componente das paredes das células, mas acima de tudo, pela capacidade de conferir elasticidade à cortiça, pelo que o seu estudo é de elevado interesse para a indústria corticeira.

Investigações realizadas à estrutura da suberina, apontam para que possua uma estrutura de dois domínios – polialifático e poliaromático. No que diz respeito ao domínio polialifático, encontra-se entre a parede celular primária e a plasmalema. Análises químicas à composição qualitativa e quantitativa dos monómeros de suberina, indicam variações de número de monómeros de acordo com a espécie de sobreiro. Alguns monómeros alifáticos comuns incluem  $\alpha$ -hidroxiácidos (principalmente o ácido 18-hidroxiocetadec-9-enóico) e  $\alpha,\omega$ -diácidos (principalmente o ácido octadec-9-ene-1,18-dióico). No que diz respeito aos monómeros da componente poliaromática, os mais comuns, incluem ácidos hidroxincinâmicos e derivados, como feruloiltiramina. <sup>[12,13,14]</sup>

Para além destes dois principais constituintes, o glicerol surge como componente principal da suberina em algumas espécies. Este composto, permite interligar monómeros

alifáticos a monómeros poliaromáticos, durante o processo de polimerização da suberina. Na Figura 5, pode-se observar a estrutura modelo da suberina. <sup>[14]</sup>

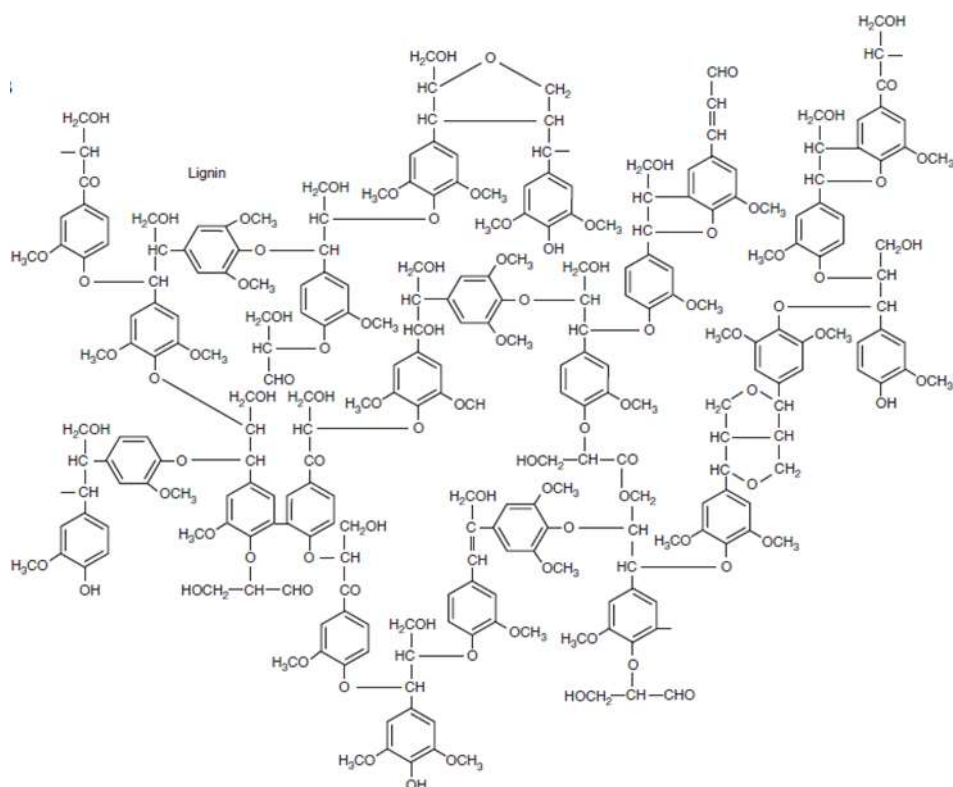


**Figura 5** - Estrutura modelo da suberina. <sup>[14]</sup>

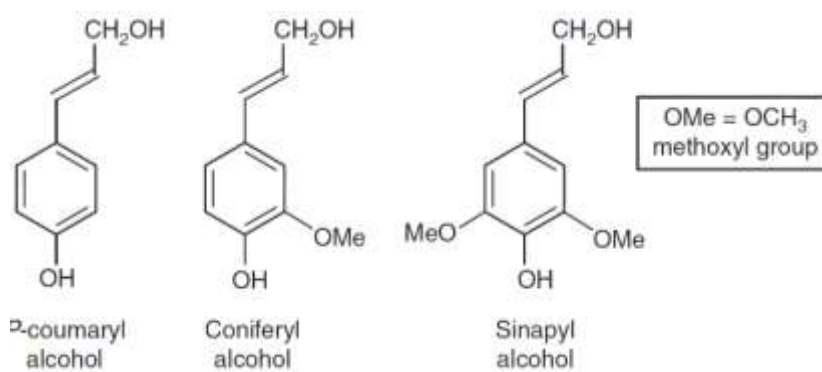
### 2.3.2 Lenhina

A lenhina, representada na Figura 6, apresenta-se como uma estrutura polimérica, constituída por monómeros (Figura 7) de fenilpropano, designadamente - álcoois aromáticos p- coumarílico, coniferílico e sinapílico. As proporções destes monómeros é variável dependendo de cada espécie de vegetal.

A lenhina tem uma elevada importância pela capacidade de conferir capacidades isolantes à cortiça. <sup>[15,16]</sup>



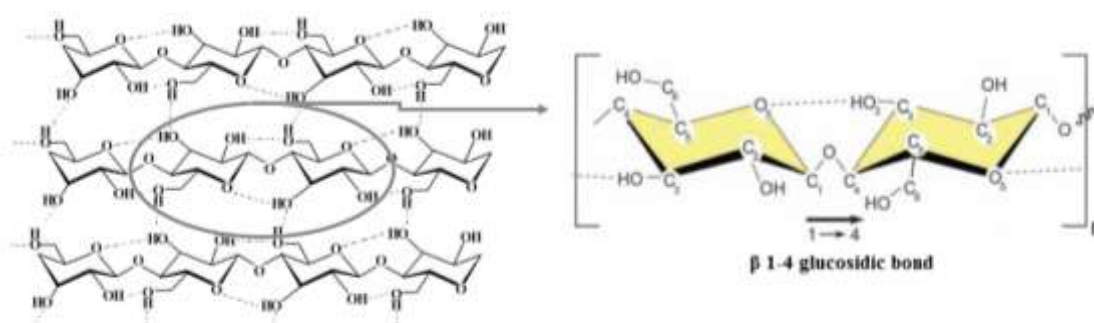
**Figura 6** - Figura esquemática de uma célula polimérica de lenhina <sup>[16]</sup>



**Figura 7** – Monómeros dos álcoois aromáticos p- coumarílico, coniferílico e sinapílico

### 2.3.3 Polissacarídeos (Celulose e Hemicelulose)

A celulose, representada na [Figura 8](#) é um homopolímero (com apenas um segmento de n) com unidades estruturais de  $\beta$ -D-glucose (ligações glicosídicas). Devido à sua estrutura linear e ao seu elevado número de oxigénios, diversas pontes de hidrogénio intra e intermoleculares são possíveis, o que explica o facto deste composto configurar uma forma microcristalina. <sup>[17]</sup>



**Figura 8** - Representação Química da Celulose <sup>[17]</sup>

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos constituídos por diferentes monómeros, como por exemplo, D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabionse, D-ácido glucorónico e ácido 3-O-metil-D-glucorónico. As hemiceluloses diferem da celulose pela sua massa molecular e grau de polimerização, contendo no máximo 200 monómeros.

A importância destes constituintes, prende-se ao facto de se considerarem fortes componentes estruturais das paredes das células de cortiça, reforçando desta forma a natureza do material. <sup>[17]</sup>

### 2.3.4 Extratáveis

Os compostos extratáveis consideram-se todos os componentes de baixo peso molecular que podem ser extraídos da cortiça utilizando solventes.

Uma enorme variedade de compostos pertencem à classe de extratáveis, exemplos como n-alcanos, n-alcanóis, ceras, triterpenos, ácidos gordos, gliceróis, esteróis, fenóis e polifenóis, podendo ser divididos em duas classes de acordo com a sua polaridade.

A **fração lipofílica** é constituída por compostos como Betulina, Cerina, Fridelina e ácido betulínico solubilizados por solventes pouco polares, como por exemplo diclorometano. <sup>[18]</sup>

Por outro lado, também apresentam **compostos fenólicos** de elevada polaridade, solúveis em água e álcool. De realçar que são representantes de 6-9% da massa da cortiça e são exemplos Ácido Gálico, Ácido Elágico, Ácido Hidroxifenil-lático, Narigenina, Eriditiol, Ácido Quínico e Ácido Salicílico. <sup>[18,19]</sup>

### 2.3.5 Outros Componentes

Para além da estrutura orgânica principal, é de referir que os componentes inorgânicos também apresentam algum relevo como constituintes da cortiça-

Componentes iónicos como o cálcio, fósforo, sódio, potássio e magnésio são exemplos de iões detetados neste material, sendo que o catião cálcio representa 60% da composição global. <sup>[17]</sup>

## 2.4 Processo de Preparação e Produção de Rolhas

O processo de produção de rolhas naturais na Amorim & Irmãos apresenta várias etapas, sendo a primeira o **descortiçamento**. Este estágio, corresponde ao momento no qual a cortiça é retirada do sobreiro em placas semelhantes a um retângulo, intituladas de pranchas. Após este período, separam-se as pranchas de acordo com a sua aplicação e qualidade sendo empilhadas ao ar livre num período mínimo de 6 meses.

De seguida, procede-se para a etapa de **cozedura**, processo em que ocorre uma lavagem da cortiça utilizando água a temperatura suficientemente elevada de forma a promover a desinfeção da cortiça, extração de substâncias hidrossolúveis, aumento de espessura e elasticidade e amaciamento das pranchas.

Na etapa seguinte, dá-se um fenómeno de **estabilização**, onde as pranchas são secas ao meio ambiente num período mínimo de 1 semana e máximo de 4, em que ocorre aplanamento de forma a que atinjam uma dureza e um teor de humidade ideal para o seu corte. Após este período, ocorre a separação das pranchas por classes, tendo como fundamento a sua qualidade, espessura e defeitos que apresentam.

O estágio seguinte corresponde à **rabaneação**, processo no qual as pranchas de cortiça são cortadas manual ou semi-automaticamente em “tiras” de modo a obterem a largura adequada à produção de rolhas. Após a rabaneação, a **brocagem** é uma fase, em que se efetuam perfurações perpendicularmente ao crescimento da cortiça para que os canais lenticulares (poros) fiquem perpendiculares ao comprimento da rolha.

De seguida, prossegue-se para um processo de **retificação dimensional**, no qual os topos e o corpo das rolhas são otimizados e corrigidos de forma a obter dimensões finais, sendo de seguida escolhidas através de uma **escolha manual e/ou eletrónica** em que ocorre a separação das rolhas por classes. O processo pode ser efetuado de forma automática, utilizando-se aparelho de leitura ótica automatizados, ou de forma manual, através de pessoal qualificado na escolha visual de rolhas.

Posteriormente, efetua-se a **lavagem e secagem**, na qual as rolhas de cortiça são submetidas a uma lavagem utilizando peróxido de hidrogénio,  $H_2O_2$ . A aplicação deste agente, assegura a limpeza, despoeiramento e desinfeção das rolhas. Após a aplicação do químico, procede uma etapa de secagem que garante que as rolhas apresentam uma humidade relativa em parâmetros normais, de modo a assegurar o bom comportamento mecânico e estabilidade microbiológica da rolha.

Realizado o estágio da lavagem e secagem, a fase de **revestimento** sucede, em que se reveste a superfície da rolha com uma camada pigmentada em rolhas previamente lavadas. O principal objetivo deste procedimento é uniformizar a cor na superfície, ou seja, melhorar a performance de vedação após o arrolhamento.

O processo segue com a **marcação**. Uma etapa em que se imprime e estampa na superfície da rolha, textos e/ou logótipos, bem como uma contramarca e o código do fornecedor (se aplicável). A etapa descrita, pode ser realizada utilizando-se marcação a tinta ou fogo.



De seguida, dá-se um **tratamento de superfície** no qual as rolhas são revestidas com produtos à base de silicone e parafina. Por um lado, a parafina garante a estanquidade da rolha na garrafa e por outro, o silicone permite a lubrificação da superfície da rolha para que esta deslize no gargalo da garrafa sem grande atrito, tanto na inserção com extração.

Por fim, a etapa final consiste num **embalamento/expedição**. Após o tratamento, contam-se as rolhas, embalam-se em sacos de polietileno selados a vácuo com SO<sub>2</sub>, para evitar possível desenvolvimento microbiológico. Após o acondicionamento em caixas de cartão, são expedidas para o cliente.

De denotar que todo este processo deve de ser controlado, pelo que para se proceder a estas etapas, o estudo dos contaminantes sensoriais da rolha apresenta-se como uma etapa de grande relevo. De seguida, demonstra-se como se forma um dos principais contaminantes, o TCA, vulgarmente designado pelo “gosto de rolha”, bem como formas de o degradar para garantir a qualidade das rolhas de cortiça de Amorim & Irmãos. <sup>[20]</sup>

Com o desenvolvimento da empresa, foram surgindo outros departamentos em função das necessidades e exigências que foram surgindo no mercado. Um dos marcos cronológicos mais importantes, foi a implementação de um departamento com a finalidade de resolução e quantificação dos contaminantes da cortiça. Deste modo, surgiu o Departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D) com o objetivo de eliminação do 2,4,6-Tricloroanisol (TCA), melhoria do conhecimento do produto, performance e otimização da produção corticeira bem como novas lavagens de rolhas de cortiça <sup>[1]</sup>.

## 2.5 Breve Menção aos Contaminantes Existentes na Rolha

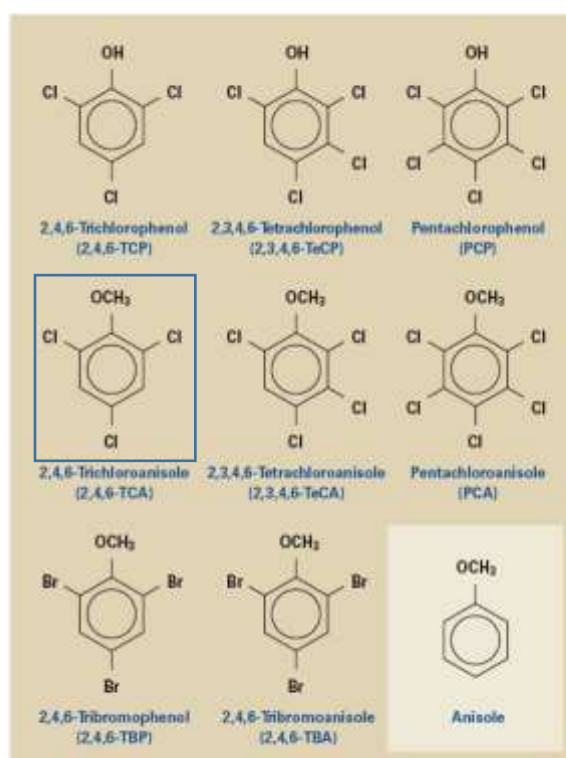
Os contaminantes presentes na rolha de cortiça são uma grande ameaça detetada pela indústria corticeira. O seu estudo, é uma mais-valia para fixar clientes no uso de produtos de rolhas de cortiça ao invés de plásticos e outras formas de engarrafamento polimérico, que segundo os seus fabricantes são isentos de “gosto de rolha”.

O odor a **2,4,6-Tricloroanisol**, conhecido como essencialmente TCA, é um fenómeno relativamente recorrente em qualquer produto de cortiça, mas esforços pelas diversas instituições corticeiras em especial Amorim & Irmãos, tem revelado que o estudo

da formação do TCA permite obter detalhes importantes para a sua redução ou ausência na rolha. <sup>[21]</sup>

É certo que o TCA presente nas rolhas de cortiça pode contaminar os vinhos, todavia estudos recentes demonstram que este composto não é o único composto responsável pela passagem de maus odores para o vinho. Cloroanisóis (tetra e pentacloroanisóis) também são contaminantes co-responsáveis pelo odor a mofo e cartão molhado encontrado em diversos vinhos. De notar, que em rolhas naturais, foi encontrado um nível médio de contaminação de cerca de 5,6% por TCA. De acordo com Sefton e Simpson <sup>[21]</sup>, praticamente toda a cortiça natural contém TCA, mas na maioria dos casos, como a concentração é baixa, não contamina o vinho engarrafado.

Os haloanisóis e os halofenóis são os principais responsáveis pela contaminação do vinho dando origem a provas sensoriais com odores desde cartão molhado, bolor e mofo. Estes odores são de fácil deteção pelo olfato e o paladar, devido aos baixos limites de deteção a nível sensorial em água, soluções hidroalcoólicas e vinho. Na [Figura 9](#) pode-se observar os diferentes halofenóis e haloanisóis. <sup>[22]</sup>



**Figura 9** - Halofenóis e Haloanisóis mais detetados em rolhas de cortiça <sup>[22]</sup>

Os diferentes haloanisóis e halofenóis podem ser formados na rolha através de diferentes vias, como por exemplo - os poros possuem uma estrutura aberta que permitem

a colonização do local por microrganismos, que podem acompanhar o processo produtivo da rolha. Numa rolha de cortiça pode-se encontrar uma grande quantidade de fungos (*Penicillium e Trichoderma*), leveduras e bactérias que por si só, são precursores e catalisadores naturais de cloroanisóis. [22,23]

Através da desinfecção da água potável com NaClO, que por sua vez é utilizada nos sistemas de rega do sobreiro, potenciando a formação de halofenóis. [24]

Utilização de bioácidas policlorofenólicos (desinfetantes, inseticidas) nos sobreiros, o branqueamento com agentes clorados no processamento da cortiça (hoje em dia é um método que está a cair em desuso), a lavagem dos barris de madeira com hipoclorito de sódio (NaClO), o uso de biocidas clorofenólicos nos materiais de transporte e armazenamento e a passagem da poluição atmosférica de agentes clorados persistentes (casos mais raros).

Aplicação de halofenóis tóxicos que são convertidos em haloanisóis, compostos voláteis e não tóxicos para os microrganismos. A reação de formação dos haloanisóis é um mecanismo de sobrevivência para muitos microrganismos quando expostos a ambientes poluídos com halofenóis [23,24]

## 2.6 Mecanismos da Formação dos Cloroanisóis

Os mecanismos moleculares que dão origem ao TCA ainda não são bem conhecidos, todavia diversos estudos têm permitido formular as mais diversas hipóteses, conforme sugerido por Coque. [25]

### i. Hipótese 1 (Catabolismo de compostos clorados complexos)

A formação do 2,4,6-TCA está associada ao facto de este composto ser um intermediário do catabolismo de compostos clorados complexos.

Por exemplo, o PCP e o 2,3,4,6-Tetraclorofenol (2,3,4,6-TeCP) são compostos com uma elevada toxicidade e a sua biometilação nos respetivos anisóis são uma forma de detoxificação. Os anisóis que resultam são de seguida de-halogenados dando origem a 2,4,6-TCA.

O hexaclorociclohexano sofre uma de-hidrohalogenação formando o 1,3,5-triclorobenzeno, que, por sua vez, sofre uma hidroxilação originando 2,4,6-TCP o qual é, por fim, metilado a 2,4,6-TCA. Do mesmo modo, a de-halogenação redutora do hexaclorobenzeno pode conduzir ao PCP, ao 2,3,4,6-TCP ou ao 2,4,6-TCP, os quais são depois os precursores para a reação de metilação.

**ii. Hipótese 2 (De-Halogenação de anisóis clorados complexos)**

O 2,4,6-TCA é formado diretamente a partir de cloroanisóis complexos, como o 2,3,4,6-Tetracloroanisol (2,3,4,6-TCA) e o pentacloroanisol (PCA) por um processo de de-halogenação redutivo.

**iii. Hipótese 3 (Síntese por halogenação do anisol)**

O fenol dá origem ao 2,4,6-TCA por cloração e, também por biometilação; ou, alternativamente, se o anisol fosse o precursor, então a biometilação aconteceria antes da cloração.

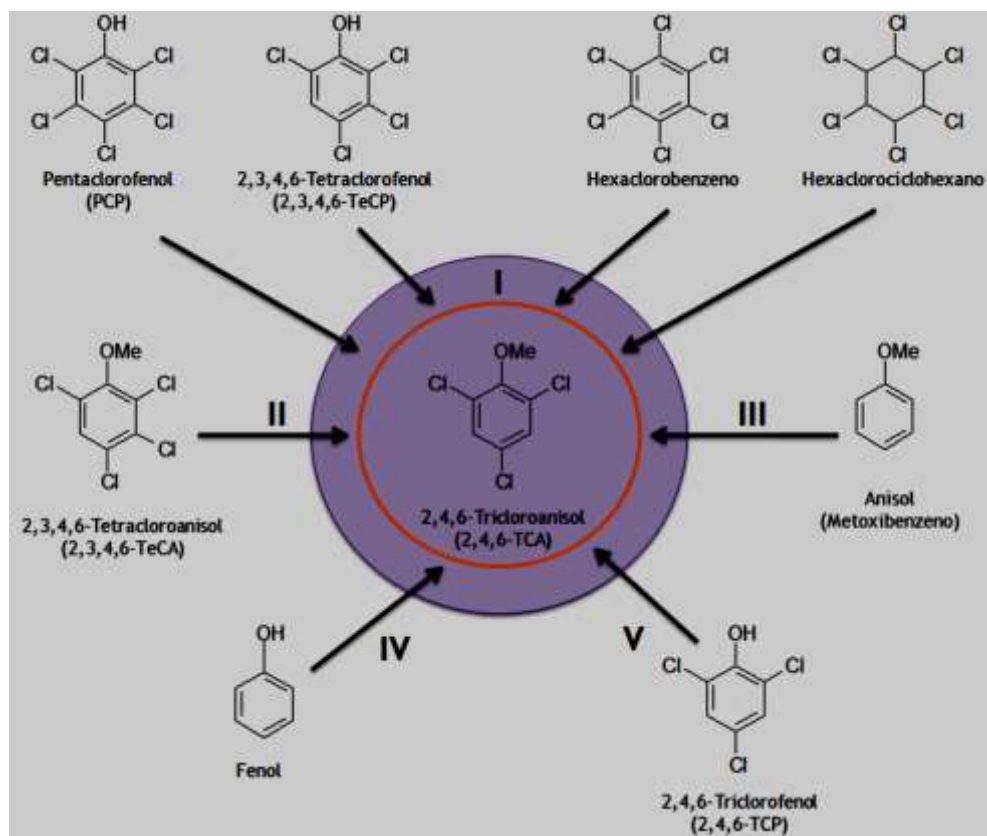
**iv. Hipótese 4 (Cloração na presença de hipoclorito de sódio e subsequente biometilação do fenol)**

O fenol é sintetizado intracelularmente a partir da glucose dando origem ao ácido shiquímico através da via das pentoses fosfato e originando o 2,4,6-TCA posteriormente por cloração.

**v. Hipótese 5 (Síntese direta por biometilação)**

Os cloroanisóis aparecem na natureza, a partir de microrganismos, diretamente da biometilação (o-metilação) do respetivo precursor clorofenol.

Todas as reações estão resumidas na Figura 10.



**Figura 10** - Diferentes mecanismos de formação de TCA <sup>[25]</sup>

As hipóteses 1 e 2 têm uma baixa probabilidade de ocorrerem, uma vez que a cortiça é um sistema aeróbio e estes mecanismos envolvem um passo de de-halogenação que ocorre principalmente em condições anaeróbias, portanto na ausência de oxigénio. De notar ainda, que a degradação aeróbia destes compostos complexos continuaria através de um mecanismo oxidativo de de-halogenação catalisado por ação enzimática (monoxigenases), dando origem a diferentes quinonas (dos dois isómeros de posição da ciclohexanodiona).

Outra hipótese de produção de cloroanisóis, prende-se com o facto da constituição intrínseca da cortiça conter constituintes como suberina e lenhina. O primeiro fator de produção de TCA pela biodegradação da suberina e o segundo pela presença de cloro em contacto com a lenhina podem-se considerar dois meios de obtenção de TCA na rolha de cortiça.

Hipoteticamente, se estão presentes fenóis e cloro, a cloração do fenol é possível originando de seguida o composto 2,4,6-TCP, que posteriormente pode ser biometilado a TCA por fungos existentes na cortiça. Todavia, considera-se que o contributo final deste

processo para a quantidade total de TCA detetado nas cortiças deverá ser mínimo, quando comparado com a quantidade originada a partir da contaminação ambiental por clorofenóis.

De facto, a incubação de uma estirpe fúngica produtora de TCA em granulado de cortiça na presença de fenol e hipoclorito, não suportou a formação eficiente do 2,4,6-TCP, quando comparado com os níveis elevados de TCA produzidos a partir da biometilação do 2,4,6-TCP.

Apesar das várias hipóteses propostas para explicar o mecanismo e a origem dos cloroanisóis, tanto na cortiça como nas adegas, correntemente, segundo a revisão bibliográfica, a única via provada é a origem do TCA a partir da biometilação do 2,4,6-TCP, hipótese 5. <sup>[25]</sup>

## **2.7 Métodos Sensoriais e Analíticos de Detecção de TCA**

### **2.7.1 Análise Sensorial**

O método sensorial permite a deteção de compostos através de aromas presentes em diferentes matrizes.

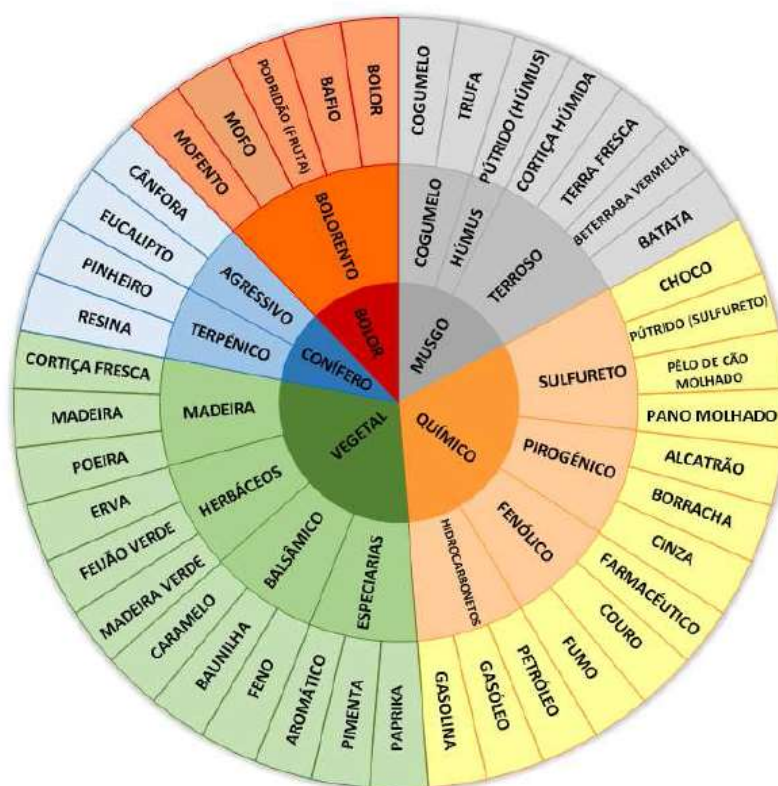
As matrizes consistem na preparação de amostras mergulhando a rolha em água, solução hidroalcoólica a 12% ou vinho.

Segundo a norma ISO 22308, a análise sensorial agrupa uma vasta variedade de odores que podem ser detetados na rolha. Na Tabela 3, apresenta-se os diferentes compostos mais detetados por esta via. <sup>[26]</sup>

**Tabela 3** Principais odores encontrados em análise sensorial segundo a norma ISO 22308 [26]

Compostos	Descrição mais comumente associada ao odor
<b>2,4,6 - Tricloroanisol</b>	Mofo
<b>2,3,5,6 - Tetracloroanisol</b>	Mofo de Adega
<b>1-Octen-3-ol</b>	Cogumelo
<b>2-Metoxifenol (Guaiacol)</b>	Fumo, Farmacêutico
<b>Geosmina</b>	Erva Húmida, Beterraba Cozida, Húmus
<b>2-Metilisoborneol</b>	Terra
<b>Acetato de Etilo</b>	Cola, Solvente
<b>4-Etilfenol</b>	Cavalariça, Suor de Cavalo
<b>Cumarina</b>	Feno Cortado

Contudo, uma grande variedade de grupos também podem ser detetados, conforme se pode observar na roda de aromas seguidamente apresentada na [Figura 11](#).

**Figura 11** - Roda de Aromas sensoriais de cortiça [26]



Para a análise sensorial, é importante denotar que há operadores experientes que podem obter diferentes limites de perceção. Estudos apontam que os limites de perceção dos mais variados *off-lavours* são os sugeridos na Tabela 4

**Tabela 4** Limites de perceção para os diferentes *off-lavours* encontrados na análise sensorial <sup>[26]</sup>

Composto	Descritor	Matriz: água		Matriz Vinho branco	
		Limite de perceção	Limite de Reconhecimento	Limite de perceção	Limite de Reconhecimento
<b>2,4,6 - Tricloroanisol</b>	Mofo	0,8 ng/L	1,0 ng/L	1,5 ng/L	4,2 ng/L
<b>2-Metoxifenol (Guaiacol)</b>	Farmacêutico, Fumo	---	---	15 µg/L	200 µg/L
<b>2-Metilisoborneol</b>	Terroso, Batata	3,2 ng/L	8,0 ng/L	29 ng/L	51 ng/L
<b>Geosmina</b>	Terroso	0,17 ng/L	0,2 ng/L	Molécula Instável em ácido	Instável em ácido
<b>2,4,6-Triclorofenol</b>	Químico, Fenólico	---	---	43µg/L	---

A análise sensorial tem algumas contrapartidas a serem otimizadas. A preparação das amostras é um problema na indústria corticeira, uma vez que, por um lado, inutiliza a rolha que é analisada e por outro lado, uma amostra de 80 ou 100 rolhas poderá não ser representativa de um lote. Na sequência dos contras da análise sensorial tradicional, desenvolveu-se um método mais eficaz na deteção de *off-lavours* nas rolhas de cortiça.

Como resposta, e otimização da análise sensorial, surgiu o **Dry Soak**. Um método de deteção olfativa de *off-lavours* não destrutivo, que permite analisar rolha a rolha o lote utilizando apenas cerca de 6 µl de solução hidroalcoólica em períodos de tempo relativamente curtos face ao método sensorial tradicional. <sup>[27]</sup>

## 2.7.2 Técnicas Utilizadas na Quantificação de TCA

### 2.7.2.1 Cromatografia de Gasosa

O método da análise química é uma mais-valia na quantificação de TCA numa rolha, aglomerado ou prancha de cortiça. (ISO 20752)



A análise química baseia-se na micro-extração em fase sólida (SPME), através de separação por cromatografia gasosa com deteção de captura eletrónica (GC/ECD) ou espetrometria de massa (GC/MS).

A análise por GC, depende portanto da etapa de extração da amostra, uma vez que nenhuma matriz pode ser injetada diretamente num cromatógrafo gasoso, portanto a técnica de SPME revelou-se de grande importância nesta análise. O acoplar de técnicas como SPME e GC, demonstra-se uma mais-valia no que diz respeito à extração de compostos voláteis e semi-voláteis. [25, 26].

A GC é uma técnica que permite a separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida num fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste que transporta os componentes da amostra até ao detetor.

Este fluxo de gás com a amostra vaporizada, passa pela coluna cromatográfica (contendo a fase estacionária), local onde ocorre separação da mistura. A Fase estacionária (FE) pode ser um sólido adsorvente (cromatografia gás-sólido) ou um filme de um líquido pouco volátil suportado sobre um sólido inerte (cromatografia gás-líquido com coluna empacotada) ou sobre a própria parede do tubo (cromatografia gasosa de alta resolução). Na cromatografia gás-líquido (CGL), os fatores a ter em consideração na separação dos constituintes de uma amostra são – a solubilidade na FE: quanto maior a solubilidade de um constituinte na FE, menor a velocidade de percurso na coluna e no que diz respeito à volatilidade, quanto maior a volatilidade do composto, maior a sua tendência de permanecer vaporizada e mais rapidamente percorre o sistema.

As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detetor. Este dispositivo, gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído (separado). Através do registo do sinal em função do tempo, obtém-se um cromatograma, com os diferentes componentes com os respetivos picos com a área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa. A GC é aplicável a constituintes que tenham pontos de ebulição não superáveis de 300°C e termicamente estáveis. [28]

### 2.7.2.2 SPME

A técnica de SPME baseia-se numa microtécnica de extração e pré-concentração de analitos. O instrumento básico consiste num bastão de fibra ótica, de sílica fundida, com uma extremidade recoberta por um filme fino polimérico ou de um adsorvente sólido.

A técnica analítica de SPME apresenta vantagens como o seu manuseamento simples, rapidez, automização de preparação de amostras, ausência de solventes orgânicos e caracterização do *headspace* da amostra, obtendo-se desta forma, um extrato representativo dos compostos responsáveis pelo aroma detetado pelo olfato.

A extração por SPME tem como ferramenta base, a cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas. O sistema ideal trifásico, apresenta uma fase sólida ou líquida, conforme o estado físico da amostra, uma fase gasosa correspondente ao *headspace* e por fim uma fase estacionária correspondente ao revestimento do suporte sólido adotado. <sup>[28]</sup>

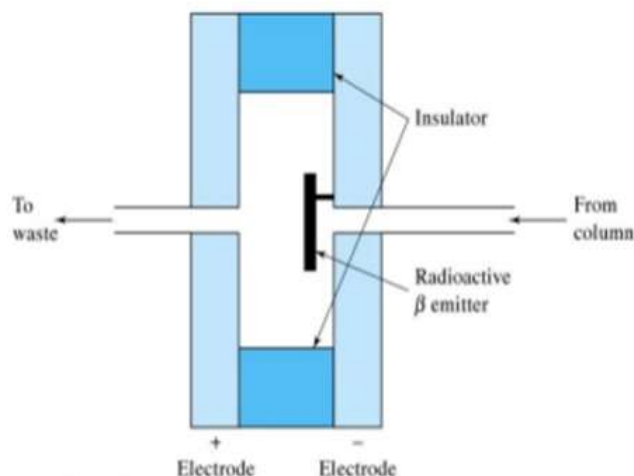
### 2.7.2.3 GC/ECD

Em 1967, James Lovelock, descobriu o ECD, um dispositivo detetor de átomos e moléculas num gás, pela ligação de eletrões através de ionização por captura de eletrões. Este dispositivo é acoplado a um cromatógrafo gasoso de forma a detetar vestígios de compostos químicos numa amostra.

O detetor de captura de eletrões, observado na Figura 12, é utilizado na deteção de compostos de elevada eletronegatividade, como por exemplo, compostos halogenados e o TCA. O detetor utiliza um marcador radioativo (uma partícula  $\beta$  emissora de eletrões) em conjunto com um gás de compensação. O emissor de eletrões consiste essencialmente numa folha de metal que contém 10 millicuries (370 MBq) do radionuclídeo  $^{63}\text{Ni}$ . No que diz respeito ao gás de compensação, o azoto considera-se um elemento de excelência, uma vez que a sua energia de ionização é reduzida, pelo que é fácil remover um eletrão a partir de uma molécula de azoto.

Os eletrões emitidos pelo emissor de eletrões colidem com as moléculas do gás de compensação dando origem a eletrões livres. Os eletrões livres, são acelerados para uma carga positiva do ânodo gerando uma corrente. No decorrer do transporte da amostra

para o detetor por um gás de purga, moléculas do analito de absorção de eletrões captam o analito, reduzindo a corrente entre o ânodo coletor de eletrões e o cátodo. Deste modo, relaciona-se a concentração do analito com a o grau de captura de eletrões através de detetores de DPI (detetores de proximidade indutivos) com sensibilidade para compostos halogenados, organometálicos, nitrilos e nitro. [29,30]



**Figura 12** - Estrutura esquemática de ECD [31]

#### 2.7.2.4 GC/MS

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica destrutiva largamente utilizada pelos químicos na análise de moléculas de diversas massas molares ( $\mu\text{g}$ - $\text{pg}$ ). A grande sensibilidade do método faz com que seja rotineiramente usado na análise de substâncias em baixa concentração, como no caso do *doping*, controlo de alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, entre muitas outras aplicações.

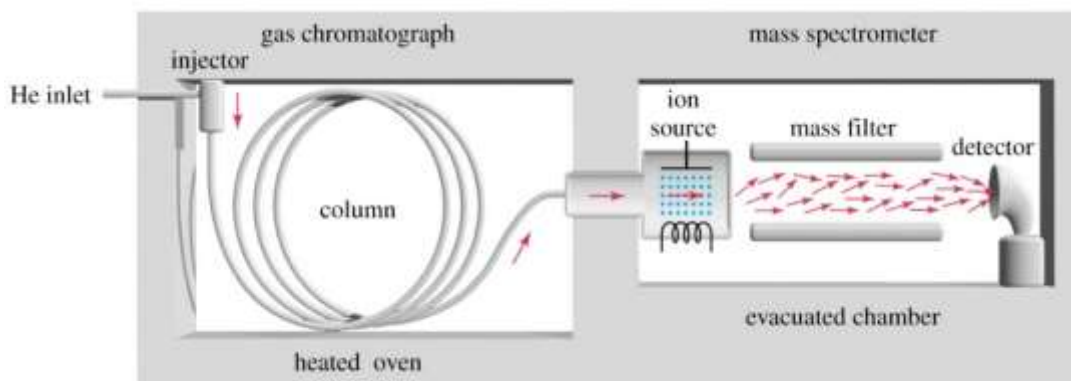
Resumidamente na espectrometria de massa, as amostras provenientes do cromatógrafo, no estado gasoso, são bombardeadas por um feixe de eletrões de alta energia. De seguida, o instrumento deteta e regista os diferentes fragmentos formados pelo impacto. A partir do valor da massa molecular de cada um dos fragmentos, monta-se a molécula. Os fragmentos gerados podem ser iões, radicais ou moléculas neutras. No dispositivo são detetados apenas os fragmentos catiónicos, os iões moleculares, de carga unitária. Estes iões possuem alta energia e são capazes de romper ligações covalentes,

fragmentando-se em pedaços menores. Logo, a partir de um fragmento, podem surgir vários outros fragmentos menores.

De notar, que para melhor resolução de espectros, devem ser tomados em conta vários aspetos. Em primeiro lugar, deve-se analisar as diferentes fontes de ionização, uma vez que para se obter uma boa resolução espectral, deve-se adequar a fonte de ionização à molécula a analisar. Há vários exemplos de fontes de ionização, como o CI (ionização química), ESI (ionização por electro-spray) e MALDI (Desorção laser por matriz assistida), tendo como principais diferenças, a aplicação a compostos mais ou menos estáveis termicamente e o peso molecular.

O analisador também deve de ser tomado em conta para uma boa filtragem de iões, sendo diferenciados pelo seu princípio de medição da razão  $m/z$  dos iões. São exemplos os Quadrupólos, Octapólos, FT-ICR e Orbitrap.

Na Figura 13, pode-se observar a imagem representativa de um equipamento de cromatografia gasosa acoplada a um analisador de massa. <sup>[32,33]</sup>



**Figura 13** - Constituição interna de um equipamento de GC/MS <sup>[33]</sup>

### 2.7.2.5 NDTech

Um dos sinónimos da Amorim & Irmãos, SA é a palavra inovação, neste sentido ao longo da última década, decidiu-se investir em equipamento, neste caso instrumentos de deteção individual de TCA, denominados **NDTech**.

A aposta da Amorim & Irmãos, neste equipamento em Janeiro de 2016, não só permite quantificar o TCA rolha a rolha, como garante que lotes com uma grande quantidade de rolhas (acima de 5000) apresentem concentrações de TCA na gama do não detetável, ou seja, abaixo dos 0,5 ng/L para o cliente.

Além desta vantagem, também permite analisar uma maior quantidade de rolhas face à análise por GC comum, para além de diminuir desperdícios económicos como gastos de tempo e preparação na maceração das rolhas e os ensaios são não destrutivos. <sup>[34]</sup>

## 2.8 Métodos de Remoção de TCA nas Rolhas de Cortiça

Ao longo do século XX, o mercado vinícola aumentou o seu nível de exigência no que diz respeito ao engarrafamento por rolhas de cortiça. Uma das reclamações mais comuns é o TCA, composto que pela sua afinidade para o vinho, desqualifica as propriedades organoléticas do vinho.

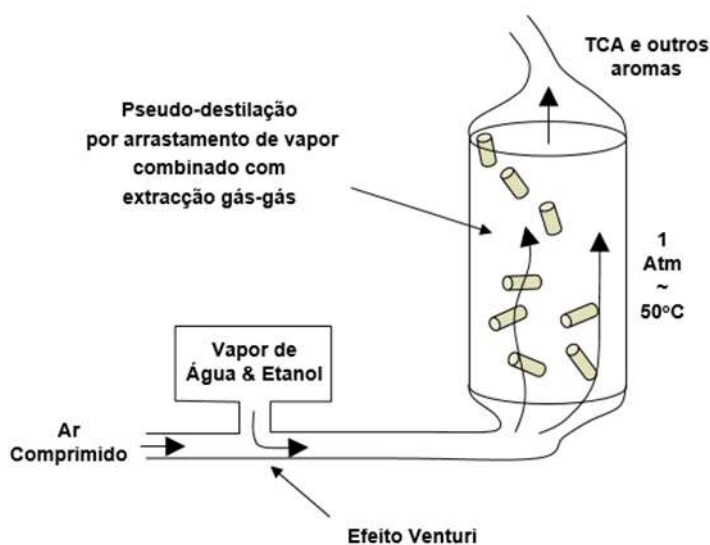
Neste sentido, a aposta da Amorim & Irmãos em estudos no combate ao TCA, foi uma importante iniciativa. Um dos estudos mais bem-sucedidos foi o desenvolvimento da tecnologia **ROSA** (*Rate of Optimal Steam Application*), Este procedimento consiste numa destilação de vapor controlado que remove componentes voláteis com uma eficácia que ronda os 90% em aglomerados de cortiça. Nestas condições, sucede um rompimento das ligações de TCA à matriz da cortiça.

Inicialmente, esta técnica afetava as propriedades físico-mecânicas da rolha e capacidade de vedação ao gás e ao líquido em rolhas de cortiça natural, porém otimizações, como a temperatura e capacidade de extração, permitiram que este processo também fosse utilizado rolhas naturais com uma remoção de componentes voláteis elevada. <sup>[35]</sup>

Novos estudos no processo ROSA foram implementados, neste sentido estudou-se métodos com uma capacidade de extração de TCA ainda mais elevada, o projeto **Super Rosa** é exemplo disso mesmo, consistindo nos princípios básicos do ROSA, todavia com temperatura e capacidade de remoção de componentes voláteis ainda mais elevada em rolhas de cortiça natural.

Para além destas técnicas, contributos como a **Vaporização** decorrente do princípio da destilação por vapor controlado de pranchas de cortiça e o **INOS II** utilizado em discos de cortiça natural, que consiste em lavar estes objetos num banho de água a sensivelmente 40°C sob ciclos de pressão e depressão de forma a remover contaminantes, são exemplos de controlo de TCA no processo de fabrico de rolhas na empresa. [36]

Na Figura 14, esquematiza-se o processo ROSA, podendo-se observar o arrastamento de vapor de água, utilizando uma temperatura de 50°C removendo componentes voláteis à superfície da rolha. [36]



**Figura 14** - Esquema do processo ROSA [37]



### **3 TRABALHO DE ESTÁGIO**

No Laboratório de Rolhas Naturais, realizam-se diariamente os diversos ensaios e tarefas. São exemplo, análise Físico-Mecânica de Rolhas, Análise Visual de Rolhas, Preparação de Amostras a enviar para o I&D, Controlo de Oxidantes, Análise de Particulados e Capilaridade, Estudos de Migração de Taninos e por fim, a Análise Sensorial.

De seguida, apresentam-se as diferentes análises realizadas bem como o procedimento a adotar em cada ensaio.

#### **3.1 Análise Físico-Mecânica ( MEDCORK)**

As características físico-mecânicas da rolha são de grande relevo para garantir futuros comportamentos da rolha durante processos como é o caso do engarrafamento, A análise das características físicas da rolha são realizadas por um equipamento denominado MedCork. No equipamento, realizam-se ensaios de dimensão, massa e humidade.

#### **3.2 Análise Visual**

As rolhas de cortiça natural são analisadas quanto à ocorrência de defeitos como consequência do processo produtivo, ou com origem na matéria-prima pode adquirir alguns defeitos visuais que devem de ser tomados em conta e analisados, para certificar a qualidade de um lote de rolhas, antes de ser enviado para o cliente final. Deste modo, evita-se o envio de lotes problemáticos para o mercado, que poderiam comprometer o engarrafamento ou até a conservação do vinho.

As rolhas naturais podem ser agrupadas em 9 classes pela seguinte ordem – Flôr, Extra, Superior, 1º a 6º em conformidade com a porosidade presente na rolha, sendo que a Flôr adquire maior valor comercial e a 6ª o menor.

Apesar dos lotes apresentarem heterogeneidade, no que diz respeito às suas classes visuais, os mesmos deverão obedecer a um padrão qualitativo previamente estabelecido. Para isso, um analista especializado na área visual, recolhe uma amostra de 100 rolhas e



desdobra-as, ou seja, analisa-as uma a uma e classifica-a consoante o seu aspeto visual. Os defeitos incluem classificações como, bicho, fenda, costa, barriga, ano seco e outros.

### **3.3 Preparação dos Soaks**

Para poder-se analisar e quantificar o TCA numa amostra de rolhas, colocam-se cerca de 10 rolhas dentro de um frasco de 250,0 ml no qual se coloca solução hidroalcoólica a 12% (solução 12% de Etanol). Após a preparação do Soak, aguarda-se um período de 24 horas para se vazar o conteúdo para um frasco de 50,0 ml, sendo de seguida enviado para o I&D, no qual procedem à análise do conteúdo. Posteriormente, os resultados são enviados para o Laboratório, que elabora um tratamento de resultados para verificar a qualidade do lote a enviar ao cliente.

### **3.4 Controlo de Oxidantes**

No processo de lavagem das rolhas Amorim & Irmãos, utiliza-se como agente químico oxidante, o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Para que este composto não afete a qualidade do vinho, como por exemplo diminua os níveis de  $SO_2$ , o Laboratório de Rolhas Naturais intervém no controlo de peróxido de hidrogénio residual, por rolha, de forma a garantir a qualidade do produto e o cumprimento do valor estipulado em vigor, neste caso, 0,2 mg/rolha.

Para o controlo do  $H_2O_2$ , utiliza-se uma tira indicadora de oxidantes.

### **3.5 Análise de Particulados e Capilaridade**

No Laboratório de Rolhas Naturais, não se garante apenas a qualidade das rolhas naturais de cortiça. Rolhas Colmatadas também são controladas, como a análise de particulados por filtração a vácuo. Desta forma, garante-se que no processo de preenchimento de poros de cortiça natural com pó de cortiça, não se coloca em causa o vinho pela passagem de algum pó devido à migração de pó para o vinho.

Para estas rolhas, o teste de capilaridade também é realizado, de forma a prever a capacidade de engarrafamento. Para o teste, utiliza-se vinho comercial numa superfície

no qual se inserem rolhas e aguarda-se um período de sensivelmente 24 horas. Posteriormente, observa-se a rolha, de forma a denotar ou não, migração de vinho pela rolha.

### 3.6 Estudo da Migração de Taninos

Um dos testes de controlo de qualidade da rolha é a determinação da absorvância do seu macerado. O estudo da coloração é uma mais-valia para indicar a presença de taninos polifenólicos, responsáveis pela transferência de líquido corante da rolha para o vinho. Deste modo, garante-se que a rolha não trará mudanças na coloração do vinho, sendo o valor limite indicado de 0,200.

De seguida, destaca-se o trabalho no qual a tese tem maior foco, a análise sensorial, sendo que maior parte dos resultados se encontram nesta fase do processo.

### 3.7 Análise Sensorial

A análise sensorial é um parâmetro de qualidade que permite observar as características organoléticas do vinho.

Segundo a norma ISO 22308, a análise sensorial de rolhas de cortiça *Cork stoppers – Sensory analysis*, sugere que os provadores treinados classifiquem os desvios organoléticos de odores nos grupos Químico, Vegetal, Bolor/Mofo, Terra e Decomposição.

No Laboratório de Rolhas Naturais, há vários métodos utilizados de deteção de *off-lavours*. O método convencional consiste numa análise de 80/100 rolhas preparadas utilizando como soluções, água ou solução hidroalcoólica, conforme requisitado pelo cliente, num período de 24 horas. Outros pré-requisitos são também fundamentais em diferentes clientes, dos quais salientam-se métodos como rolha cortada, método Amorim & Irmãos com a introdução de 5 rolhas por frasco, períodos de 48 horas de rolha em solução, são só alguns exemplos da enorme variedade de métodos utilizados. As vantagens de cada um para além do rigor e especificidade de cada cliente, há vantagens que surgem, desde a facilidade da preparação da amostra e até testes mais específicos para

cada qualidade de vinho. Todos estes fatores são importantes em momentos onde tempo vs qualidade vs recursos, são uma constante a ser balanceada na gestão do laboratório.

## **4 ESTUDOS E RESULTADOS OBTIDOS**

#### 4.1 Estudo da concentração mínima de TCA percecionada pelo método de análise sensorial tradicional para rolhas de cortiça com diferentes lavações

Para se realizar este estudo, recorreu-se ao seguinte procedimento:

Coloca-se num frasco de 50,0 ml uma rolha, de seguida perfaz-se o seu volume com água da nascente, solução hidroalcoólica ou vinho, de acordo com o requisito do cliente. Preparadas as 80 ou 100 rolhas, aguarda-se um período de 24 horas ou 48 horas, de acordo com o requisito do cliente. Decorrido este período, vaza-se o conteúdo para um copo, tapando-se logo de seguida com um vidro de relógio. Passados 30 minutos, procede-se a análise sensorial. Na [Figura 15](#) observa-se a preparação de uma amostra de rolhas para posterior análise.



**Figura 15** - Preparação de uma amostra de rolhas para análise sensorial tradicional

Para a determinação da concentração de TCA, realizou-se uma maceração individual ou coletiva. Ou seja, no caso da maceração individual, coloca-se uma rolha num frasco de sensivelmente 100,0 ml, aguardando-se 24 horas até se vazar o líquido macerado para um frasco de 50,0 ml. No caso da maceração coletiva, coloca-se 10 rolhas num frasco de 500,0 ml realizando-se o mesmo procedimento do macerado individual.

De seguida, envia-se o conteúdo para o I&D, local onde se realiza a determinação cromatográfica do macerado, utilizando um cromatógrafo GC-ECD Varian CP3800. O padrão interno utilizado foi o 2,3,6-TCA. Para o SPME utilizou-se a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS).

Após o procedimento, recorreu-se à recolha de resultados obtidos para as diferentes lavações de rolhas detetadas sensorialmente como rolhas contaminadas com TCA.

De seguida, apresentam-se os resultados de várias análises sensoriais para estudo do limite de perceção sensorial, para rolhas com diferentes lavações e diferentes métodos estabelecidos por clientes da empresa.

Na Tabela 5, encontram-se os valores obtidos através de análise cromatográfica após deteção sensorial para a lavação *Clean 0* (CI0).

**Tabela 5** Estudo da concentração mínima de TCA percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação CI0, através de análise cromatográfica de rolhas contaminadas

Rolha	Lavação	Cliente	TCA  (ng/L)
1	CI0	G	2,7
2	CI0	G	9,9
3	CI0	G	4,7
4	CI0	G	1,6
5	CI0	G	2,5
6	CI0	C	4,3
7	CI0	C	2,0
8	CI0	C	4,8
9	CI0	B	33,6
10	CI0	B	40,3
11	CI0	B	56,7
12	CI0	B	5,0
13	CI0	B	2,6
14	CI0	B	0,7
15	CI0	B	48,2

Conforme se pode observar na tabela, nas rolhas de lavação CI0, a concentração de 0,7 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

Na Tabela 6 apresenta-se, os resultados obtidos para o estudo do limite de perceção sensorial da lavação, *Clean2000* (CI2000)

**Tabela 6** Estudo da concentração mínima de TCA percecionada por análises sensorial para rolhas com lavação CI2000 através de análise cromatográfica

Rolha	Lavação	Cliente	TCA  (ng/L)
-------	---------	---------	-------------

1	CI2000	C	1,8
2	CI2000	C	7,6
3	CI2000	C	0,9
4	CI2000	C	5,9
5	CI2000	C	6,8
6	CI2000	C	0,9
7	CI2000	C	6,8
8	CI2000	C	1,5
9	CI2000	C	3,1
10	CI2000	C	6,9
11	CI2000	E	20,1
12	CI2000	E	24,8
13	CI2000	E	108,5
14	CI2000	E	193,9
15	CI2000	E	3,9
16	CI2000	E	3,5
17	CI2000	E	40,8
18	CI2000	E	1,5
19	CI2000	E	2,1

Conforme se pode observar na tabela, nas rolhas de lavação CI2000, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

Outro facto observado, são as concentrações de TCA mais elevadas para as rolhas para o cliente E destacadas a azul. O sucedido, deve-se ao pré-requisito do cliente, que define que se coloque as rolhas em solução hidroalcoólica, em vez de água, e num período de 48 horas. Conforme a bibliografia <sup>[23]</sup> O TCA é naturalmente mais atraído para o etanol do que para a cortiça. Quando a cortiça contaminada com TCA se encontra em contacto com as moléculas de etanol, separam-se da matriz para o próprio vinho.

De seguida, estudou-se também a lavação Nova101. Na Tabela 7 resume-se os resultados obtidos para o estudo do limite de perceção sensorial para rolhas com lavação Nova101, através de análise cromatográfica.

**Tabela 6** Estudo da concentração mínima de TCA percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação Nova101, através de análise cromatográfica

Rolha	Lavação	Cliente	TCA  ( ng/L)
1	Nova101	L	1,6

2	Nova101	L	14,4
3	Nova101	L	2,3
4	Nova101	L	1,2
5	Nova101	L	4,3
6	Nova101	L	2,9
7	Nova101	L	1,7
8	Nova101	L	2,2
9	Nova101	L	3,5
10	Nova101	L	0,9

Na Tabela 6, verifica-se que, nas rolhas de lavação Nova101, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

De seguida, na Tabela 7, observam-se 10 amostras de rolhas *Light* as quais foram submetidas a um estudo do limite de perceção sensorial para rolhas com lavação *Light* através de análise cromatográfica.

**Tabela 7** Estudo da concentração mínima percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação *Light* através de análise cromatográfica

Rolha	Lavação	Cliente	TCA  ( ng/L)
1	Light	S	6,3
2	Light	S	8,3
3	Light	G	3,5
4	Light	G	0,9
5	Light	G	9,6
6	Light	G	1,6
7	Light	S	66,8
8	Light	S	48,4
9	Light	S	22,8
10	Light	S	19,6
11	Light	S	51,3

Conforme se pode observar na tabela, nas rolhas de lavação *Light*, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

Os valores destacados a verde, são concentrações acima de 10,0 ng/L de TCA. Conforme se pode verificar, pertencem a rolhas requisitadas para o cliente S. Os valores obtidos podem ser justificados pelo pré-requisito do cliente de se cortar as rolhas, 24 horas

antes de se efetuar análise sensorial às rolhas. Este método, segundo a bibliografia, <sup>[23]</sup> permite extrair uma maior concentração de TCA para a solução, dado que no interior da rolha de cortiça, exista uma grande concentração de lenhina, um intermediário de compostos fenólicos, que por ação microbiana e fúngica, dá origem a TCA. Outro fenómeno, poderá dever-se a que a lavagem da rolha, seja eficaz apenas à superfície da rolha. Contudo a lavagem não remove TCA no interior da rolha, que poderá surgir em solução, devido ao corte da rolha. Assim, a rolha terá maior concentração de TCA no interior não lavado, face ao exterior. Deste modo, poderá explicar-se a razão para a deteção de rolhas com TCA de elevada concentração para as rolhas deste cliente.

De seguida, resume-se na Tabela 8, os valores referentes a rolhas contaminadas com TCA da lavagem *Clean 2000C*, CI2000C, no qual se efetuou o estudo do limite de perceção sensorial para as rolhas com lavagem CI2000C, através de análise cromatográfica.

**Tabela 8** Estudo da concentração mínima percecionada por análise sensorial para rolhas com lavagem CI2000C, através de análise cromatográfica

Rolha	Lavagem	Cliente	[TCA] (ng/L)
1	CI2000C	Q	1,8
2	CL2000C	Q	1,6
3	CI2000C	Q	7,2
4	CI2000C	Q	2,0
5	CI2000C	Q	4,3
6	CI2000C	Q	2,9
7	CI2000C	Q	1,7
8	CI2000C	Q	2,2
9	CI2000C	Q	3,5
10	CI2000C	Q	0,9

Ao analisar-se a Tabela 8 denota-se que em rolhas de lavagem CI2000C, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”

De seguida, apresenta-se a Tabela 9, com os resultados para a lavagem *Nature*.



**Tabela 9** Estudo da concentração mínima percecionada por análise sensorial para rolhas com lavação *Nature* através de análise cromatográfica

Rolha	Lavação	Cliente	[TCA] (ng/L)
1	Nature	B	5,2
2	Nature	B	2,9
3	Nature	B	20,0
4	Nature	B	7,2
5	Nature	A	3,4
6	Nature	A	3,3
7	Nature	AI-Testes lavação	2,0
8	Nature	AI-Testes lavação	0,9
9	Nature	AI-Testes lavação	3,5
10	Nature	B	1,4

Na tabela, verifica-se que para a lavação *Nature*, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

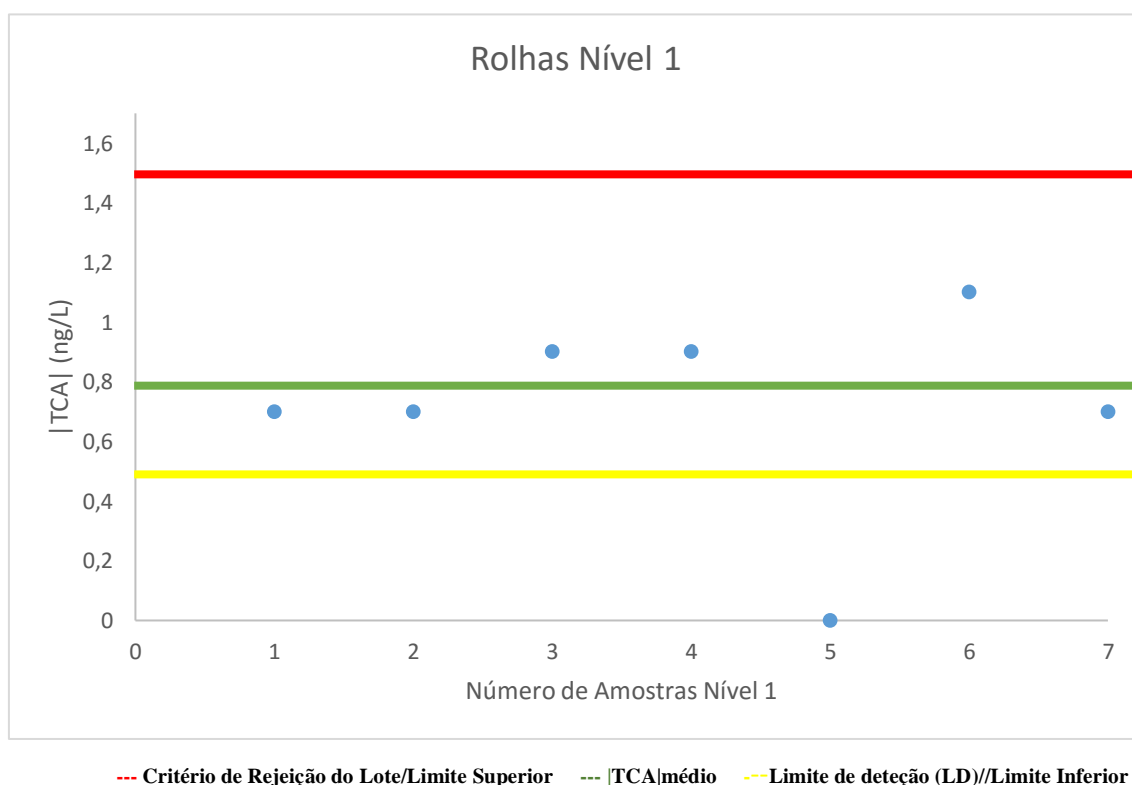
#### 4.2 Controlo do método de análise sensorial tradicional por comparação com o método da análise cromatográfica

No decorrer da análise sensorial tradicional de rolhas naturais de cortiça, todos os provadores realizam um relatório com detalhes acerca dos *off-lavours* detetados. Neste caso, decidiu-se estudar a capacidade de um único provador, em detetar TCA nos mais diferentes níveis, desde TCA duvidoso (nível 1), a TCA ligeiro (nível 2), TCA médio (nível 3) e TCA forte (nível 4) bem como teste a falsos positivos que possam ocorrer no decorrer da análise sensorial. Através de um universo de 100 rolhas detetadas como positivos de TCA, realizou-se após cada prova sensorial, a análise cromatográfica de cada rolha de forma a validar a intensidade descrita pelo provador no relatório, bem como se nesta amostra surgem falsos positivos.

#### 4.2.1 Rolhas de Cortiça Classificadas como Nível 1 por análise sensorial tradicional

Na carta de controlo da [Figura 16](#), são apresentados os resultados de TCA de 7 rolhas classificadas na análise sensorial como duvidosas (nível 1), quanto ao TCA. O valor mais baixo detetado cromatograficamente, foi de 0,7 ng/L e o valor mais elevado 1,1 ng/L. A média obtida foi de 0,8 ng/L.

No caso do Nível 1, as concentrações de TCA pertencem a uma gama de concentração de 0,5 ng/L até 1,5 ng/L.



**Figura 16** – Carta de controlo da concentração de TCA (ng/L) obtida por análise cromatográfica em função do número de amostra classificada por análise sensorial como nível 1 (duvidoso)

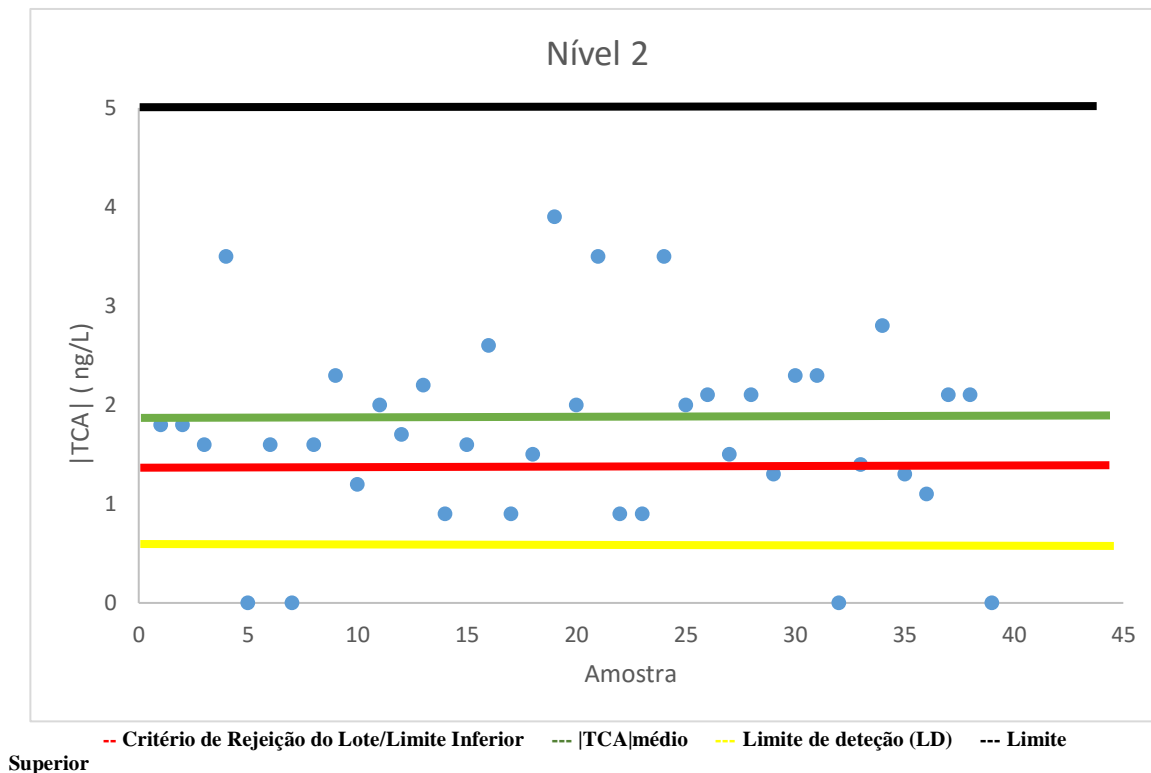
Conforme se pode observar na carta, existe um número pequeno de amostras para controlar o nível 1, uma vez que num universo de 100 rolhas apenas 7 apresentavam classificação sensorial como nível 1 (TCA duvidoso). No entanto realizou-se uma carta de controlo de modo a poder-se controlar o método sensorial tradicional para este nível.

Das 7 amostras estudadas para este nível, verificou-se apenas que a amostra número 5 foi um falso positivo. De facto, esta amostra foi classificada sensorialmente como nível 1 (TCA duvidoso), mas por análise cromatográfica apresentou um valor nd, ou seja, não detetável em TCA. Todavia, para as restantes amostras, verificou-se que o operador as classificou de forma correta e dentro dos limites [0,5; 1,5 ng/L] do nível 1.

#### 4.2.2 Rolhas de Cortiça classificadas como Nível 2 por análise sensorial tradicional

Na carta de controlo da [Figura 17](#), são apresentados os resultados de TCA de 39 rolhas classificadas na análise sensorial como nível 2 (TCA ligeiro), quanto ao TCA. O valor mais baixo detetado cromatograficamente foi de 0,9 ng/L e o valor mais elevado 3,9 ng/L. A média obtida foi de 1,9 ng/L.

No caso do Nível 2, as concentrações de TCA pertencem a um intervalo entre [1,5 e 5 ng/L].



**Figura 17** - Carta de controlo da concentração de TCA (ng/L) obtida por análise cromatográfica em função da amostra classificada por análise sensorial como nível 2 (TCA ligeiro)

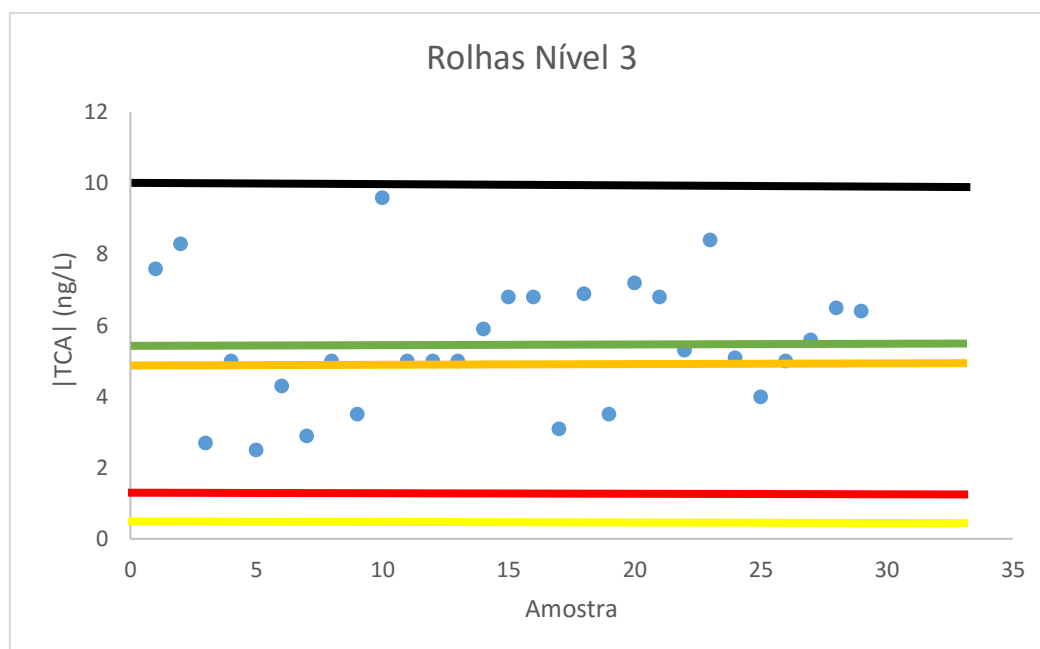
Para a carta de controlo, observa-se a presença de 4 falsos positivos, para um universo de 39 rolhas classificadas como nível 2 em TCA. Esta situação deve-se essencialmente ao facto do TCA ser de difícil deteção, para concentrações de TCA abaixo de 2,0 ng/L, podendo ser confundido até com outros aromas muito semelhantes olfativamente. Contudo, para as restantes amostras, verificou-se que o operador as classificou de forma correta e dentro dos limites [1,5; 5,0 ng/L] do nível 2 em TCA.

Também se verificou a presença de 8 rolhas classificadas como nível 2 (TCA ligeiro), verificando-se por cromatografia, que pertencem ao nível 1 (TCA duvidoso).

#### **4.2.3 Rolhas de Cortiça Classificadas como Nível 3 por análise sensorial tradicional**

Na carta de controlo da Figura 18, são apresentados os resultados de TCA de 29 rolhas classificadas na análise sensorial como nível 3 (TCA moderado), quanto ao TCA. O valor mais baixo detetado cromatograficamente, foi de 2,5 ng/L e o valor mais elevado 9,6 ng/L. A média obtida foi de 5,5 ng/L.

Para o Nível 3, as concentrações de TCA pertencem a um intervalo de concentração de [5;10 ng/L]



--- Crítério de Rejeição do Lote    --- TCA|médio    --- Limite de deteção do método (LD)    --- Limite Superior do nível 3  
 --- Limite Inferior do nível 3

**Figura 18** – Carta de controlo representando a concentração de TCA (ng/L) obtida por análise cromatográfica em função da amostra classificada por análise sensorial como nível 3 (moderado)

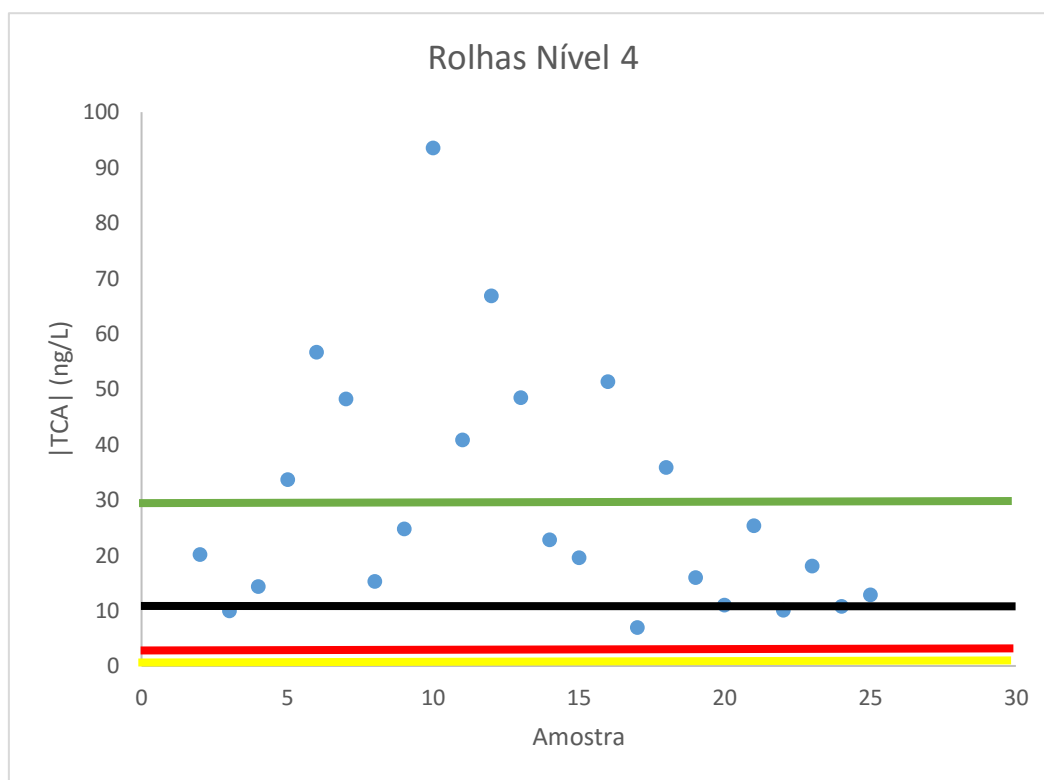
Para o gráfico anterior, não se observa a presença de falsos positivos, para um universo de 29 rolhas classificadas como TCA nível 3. Contudo, a grande maioria das amostras apresenta-se com uma concentração de TCA detetável. Verifica-se também que o operador rejeita todas as rolhas com TCA acima de 1,5 ng/L, valor de referência para a rejeição de uma rolha com TCA. Assim, assegura-se que no decorrer da análise sensorial, se detetem concentrações de TCA acima ou abaixo do valor de referência de 1,5 ng/L.

Outro detalhe observado, foi que o operador apesar de classificar o TCA como nível 3, nestas amostras, observou-se que em alguns casos, nas amostras 3,5,6,7,9,17,19 e 25, o valor de TCA encontrado na análise cromatográfica, corresponde a uma classificação sensorial de nível 2. Contudo, para as restantes amostras, verificou-se que o operador as classificou de forma correta e dentro do limite [5,0; 10,0] ng/L

#### 4.2.4 Rolhas de Cortiça Classificadas como Nível 4 por análise sensorial tradicional

Na carta de controlo da [Figura 19](#), são apresentados os resultados de TCA de 25 rolhas classificadas na análise sensorial como nível 4 (TCA forte), quanto ao TCA. O valor mais baixo detetado cromatograficamente, foi de 9,9 ng/L e o valor mais elevado 93,5 ng/L. A média obtida foi de 29,7 ng/L.

Para o Nível 4, são consideradas todas amostras com  $TCA > 10,0$  ng/L.



--- Critério de Rejeição do Lote    --- |TCA|médio    --- Limite de deteção (LD)    --- Limite Superior    --- Limite Inferior

**Figura 19** - Carta de controlo representando a concentração de TCA (ng/L), obtida por análise cromatográfica, em função da amostra classificada por análise sensorial como nível 4 (forte)

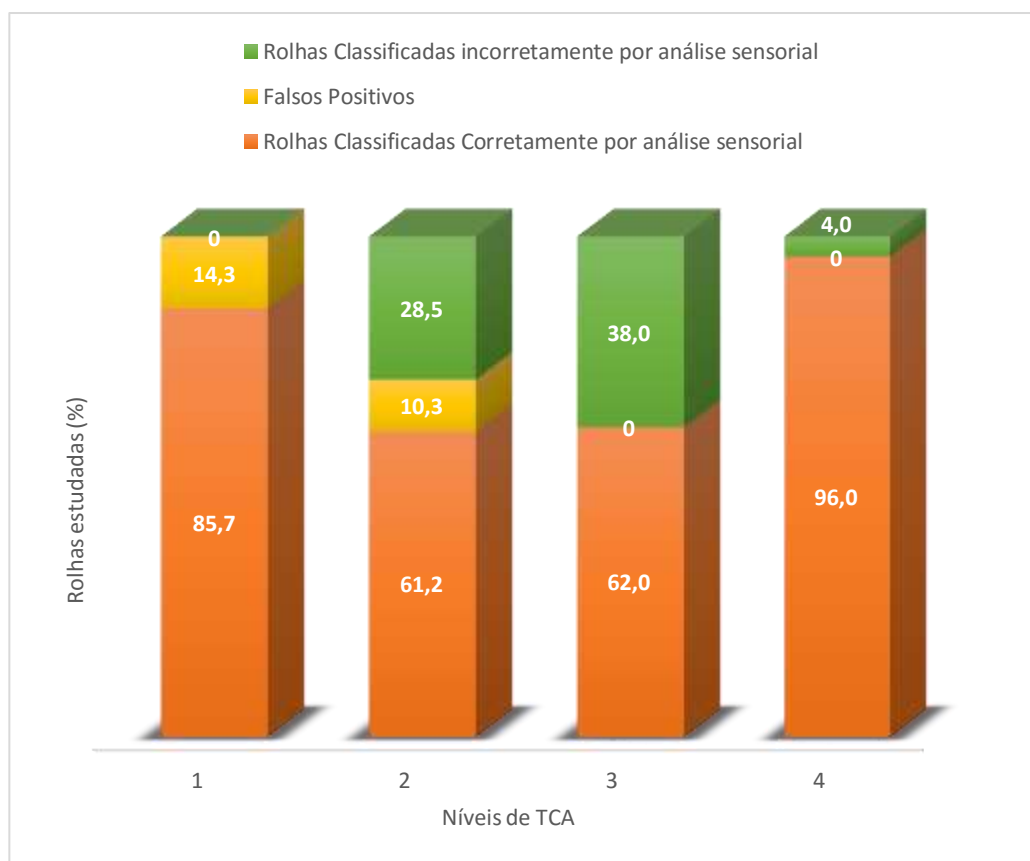
Analisando-se a figura acima, não se observa a existência de falsos positivos, para um universo de 25 rolhas classificadas como nível 4. De salientar, que todas as amostras apresentam-se com uma concentração de TCA detetável. Verifica-se também, que o

operador rejeita todas as rolhas com TCA acima de 1,5 ng/L, valor de referência para a rejeição de uma rolha com TCA..

Na carta verificou-se que apesar de se classificar o TCA como nível 4, nestas amostras, observou-se que em alguns casos (amostras 2 e 17), não é verdade, sendo de TCA de nível 3 (TCA moderado). Apesar disso, para as restantes amostras, verificou-se que o operador as classificou de forma correta detetando-se concentrações acima de 10,0 ng/L.

#### **4.2.5 Falsos positivos e classificações sensoriais incorretas**

De forma a sintetizar os resultados anteriormente referidos, os mesmos são apresentados em outro formato gráfico (Figura 20), colocando em evidência a percentagem de rolhas com TCA consideradas positivos e falsos positivos, bem como as rolhas classificadas por análise sensorial correta ou incorretamente para cada nível de TCA.



**\*Universo de 100 rolhas contaminadas com TCA**

**Figura 20** - Percentagem de falsos positivos na análise sensorial dentro de cada nível sensorial.

Conforme se pode observar, o nível 1, apresenta 85,7% de rolhas classificadas de forma correta através de análise sensorial e foram detetadas cromatograficamente 14,3% de rolhas classificadas como rolhas nd, ou seja, falsos positivos. No nível 2, verifica-se apenas que 61,2% das rolhas foram classificadas corretamente quanto ao nível de TCA percecionado sensorialmente. Contudo, observa-se a presença de 10,3 % de rolhas detetadas como falsos positivos por cromatografia e 28,5% classificadas de forma incorreta quanto ao nível de TCA. Para o nível 3, observa-se que 62,0% das rolhas foram classificadas corretamente e 38,0% foram classificadas indevidamente quanto ao nível de TCA percecionado sensorialmente. Verifica-se também que o nível 3 não apresenta falsos positivos. Para o nível 4, verifica-se que 96% das rolhas foram classificadas corretamente e 4,0% indevidamente quanto ao nível de TCA percecionado sensorialmente, não se verificando a presença de falsos positivos.

Deste modo, verifica-se que a análise sensorial pelo método tradicional é um método eficaz para a deteção de rolhas com TCA, pois apesar da presença de falsos



positivos, a percentagem de rolhas percecionadas com TCA, e que de facto contém TCA em todos os níveis, é muito mais elevada que a percentagem de rolhas falsos positivos [10-15] %, visualizada nos dois primeiros níveis.

Quanto à percentagem de rolhas classificadas incorretamente no seu nível de TCA, apesar de no nível 3 existir uma maior percentagem de erro (38%), espera-se que no futuro o operador ganhe sensibilidade sensorial através de realização de ensaios sensoriais, de forma a classificar as rolhas corretamente no seu nível de TCA, em especial nos níveis 2 e 3.

### **4.3 Avaliação do Método *Dry Soak***

Para a avaliação do método, recorreu-se ao seguinte protocolo experimental desenvolvido ao longo do estágio na Amorim & Irmãos.

#### **4.3.1 Ensaio sensorial por *Dry Soak* e Implementação nas diferentes UI's**

- 1) Pulveriza-se cada frasco com solução hidroalcoólica a 12% de forma a obter um ambiente húmido;
  - Rolhas não marcadas – Pulveriza-se 2 vezes;
  - Rolhas marcadas – Pulveriza-se 3 vezes;
- 2) Coloca-se 6  $\mu$ L de solução hidroalcoólica em cada frasco, colocando-se de seguida as rolhas em cada frasco na quantidade estabelecida na Tabela 10;
- 3) Fecha-se os frascos utilizando as tampas previamente protegidas com papel de alumínio e aguarda-se:
  - 24h à temperatura ambiente;
  - Sensivelmente 2h utilizando a estufa a uma temperatura de 40°C;
- 4) Após este período, realiza-se a análise sensorial pelo painel de analistas sensoriais;
- 5) Os positivos que se detetaram com mais de 1 rolha por frasco, devem ser novamente analisados, mas desta vez pretende-se uma análise por *Dry Soak* de rolha individual;

- 6) Por fim, quando se deteta todos os *off-flavours*, agrupa-se todo o conjunto de odores de forma a separá-los do lote ou amostra podendo até ser macerado e enviado para o I&D caso se pretenda efetuar determinação cromatográfica.

**Tabela 10** Número de Rolhas por frasco para rolhas de diferentes calibres

Comprimento (mm) Diâmetro(mm)	38	40	44	45	49	50	52
20	3	3	3	3	3	3	3
22	3	3	3	3	3	3	3
24	3	3	3	3	3	3	3
25	3	3	3	3	2	2	2
26	3	3	2	2	2	2	2
27	2	2	2	2	2	2	2
30	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1

Nas figuras 21e 22, apresentam-se duas formas de realizar *Dry Soak*.



**Figura 21** - *Dry Soak* Individual



**Figura 22** - *Dry Soak* Coletivo

Após o procedimento, compararam-se os resultados obtidos por análise sensorial tradicional e análise sensorial por *Dry Soak*.

Nas Tabelas 11 e 12 são comparados os resultados obtidos no decorrer da análise sensorial tradicional e por análise sensorial por *Dry Soak*. São também estabelecidas as concentrações mínimas de TCA percecionadas sensorialmente para ambos os métodos sensoriais.

**Tabela 11** Resultados obtidos no decorrer da análise sensorial por *Dry Soak*, bem como os resultados cromatográficos dos positivos obtidos no decorrer da análise sensorial

Rolha Analisada	Lavação	Cliente	TCA  (ng/L)
1	ClO	G	11,8
2	ClO	G	0,7
3	ClO	G	5,6
4	ClO	G	1,4
5	ClO	G	10,9
6	ClO	G	8,2
7	ClO	G	0,7
8	ClO	G	12,3
9	ClO	G	6,9
10	ClO	G	5,7
11	ClO	G	6,3
12	ClO	G	9,0
13	ClO	G	10,3
14	ClO	G	4,3
15	ClO	G	9,5
16	ClO	G	nd
17	ClO	G	5,8
18	ClO	G	2,5
19	ClO	G	6,8
20	ClO	G	nd

\* Rolhas do mesmo calibre 49x24 mm e lavação ClO

**Tabela 12** Resultados de TCA, obtidos por análise cromatográfica para rolhas classificadas através de análise sensorial, método tradicional, como positivo de TCA.

Número	Lavação	Cliente	TCA  (ng/L)
1	ClO	G	2,7
2	ClO	G	9,9
3	ClO	G	4,7
4	ClO	G	1,6
5	ClO	G	2,5
6	ClO	G	3,8
7	ClO	G	3,5
8	ClO	G	2,9
9	ClO	G	2,6
10	ClO	G	2,1
11	ClO	G	0,9
12	ClO	G	2,3
13	ClO	G	3,9
14	ClO	G	10,0
15	ClO	G	9,5
16	ClO	G	2,2
17	ClO	G	5,9
18	ClO	G	6,3
19	ClO	G	nd
20	ClO	G	nd

\* Rolhas do mesmo calibre 49x24 mm e lavação ClO

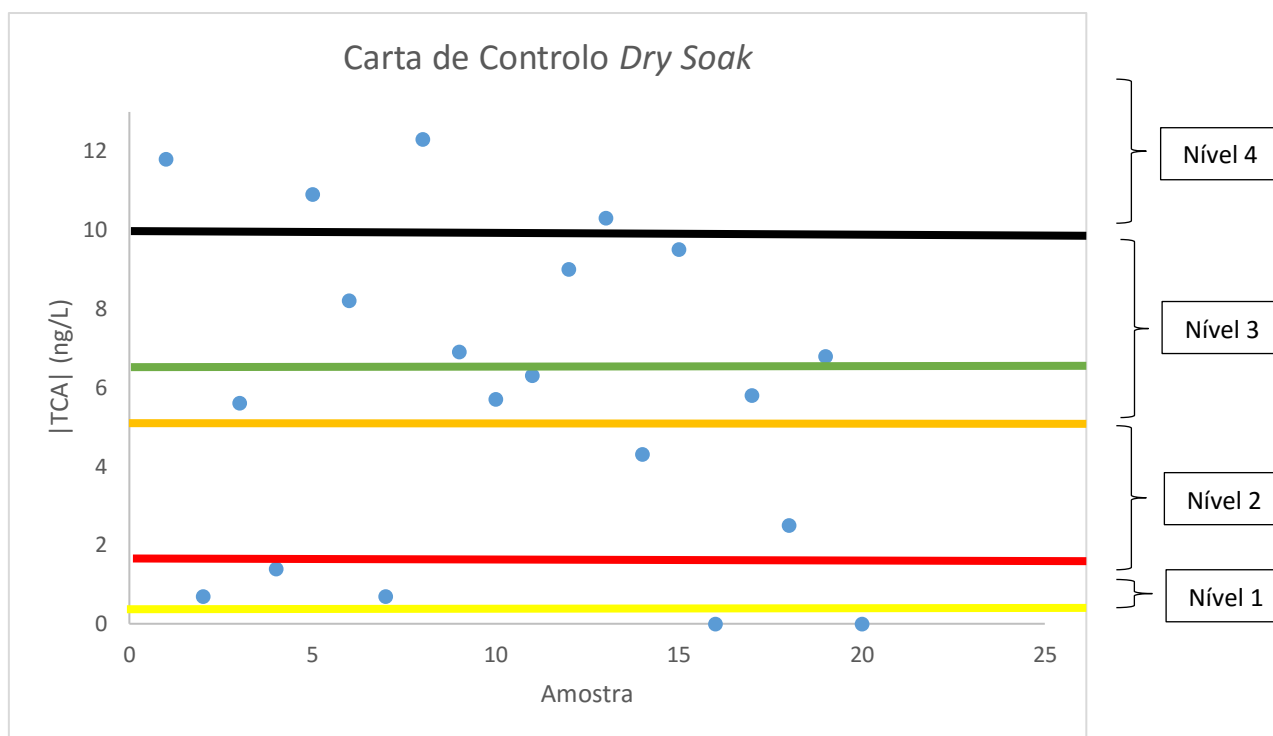
Comparando os resultados, pode-se observar que a concentração mínima de TCA percecionada sensorialmente pelo método *Dry Soak*, foi de 0,7 ng/L e pelo método tradicional 0,9 ng/L para o cliente, lavação e calibre em questão.

O resultado sugere que o método não destrutivo *Dry Soak*, aquando o operador especializado em análise sensorial elabora muitos ensaios, pode percecionar TCA a concentrações muito semelhantes ao método tradicional.

#### 4.3.2 Carta de Controlo para o método *Dry Soak*

Para se analisar o método *Dry Soak*, decidiu-se realizar uma carta de controlo de forma a obter mais informação acerca do método, uma vez que não se classificou até à data, os níveis de TCA por rolha para este método.

Assim, decidiu-se recolher os resultados da Tabela 11 de forma a analisar os resultados obtidos sensorialmente, comparando-os com a análise cromatográfica. Na Figura 23 apresenta-se uma carta de controlo de 20 amostras positivas de TCA e a sua respetiva concentração em TCA. A concentração média das amostras analisadas foi de 6,6 ng/L. A concentração de TCA mínima percecionada foi de 0,7 ng/L e a concentração máxima percecionada sensorialmente foi de 12,3 ng/L.



--- Critério de Rejeição do Lote --- [TCA|médio] --- Limite de deteção do método (LD) --- Limite Superior nível 3 --- Limite Inferior do nível 3

**Figura 23** – Carta de Controlo que representa a concentração de TCA (ng/L) em função da amostra a analisar. Para o estudo, utilizaram-se 20 rolhas positivas em TCA por análise sensorial.

Na carta de controlo, verifica-se que os resultados para as 20 amostras analisadas são bastante heterogéneos. Destaca-se também a presença de dois falsos positivos nas amostras 16 e 20.

Conforme se pode observar, apesar da heterogeneidade, os pontos encontram-se mais concentrados no nível 3 de TCA, com 9 pontos presentes neste intervalo de [5;10 ng/L]. Porém, também se observam pontos nos restantes níveis, podendo indicar que no método *Dry Soak*, o operador poderá detetar rolhas com TCA positivo nos 4 níveis de TCA.

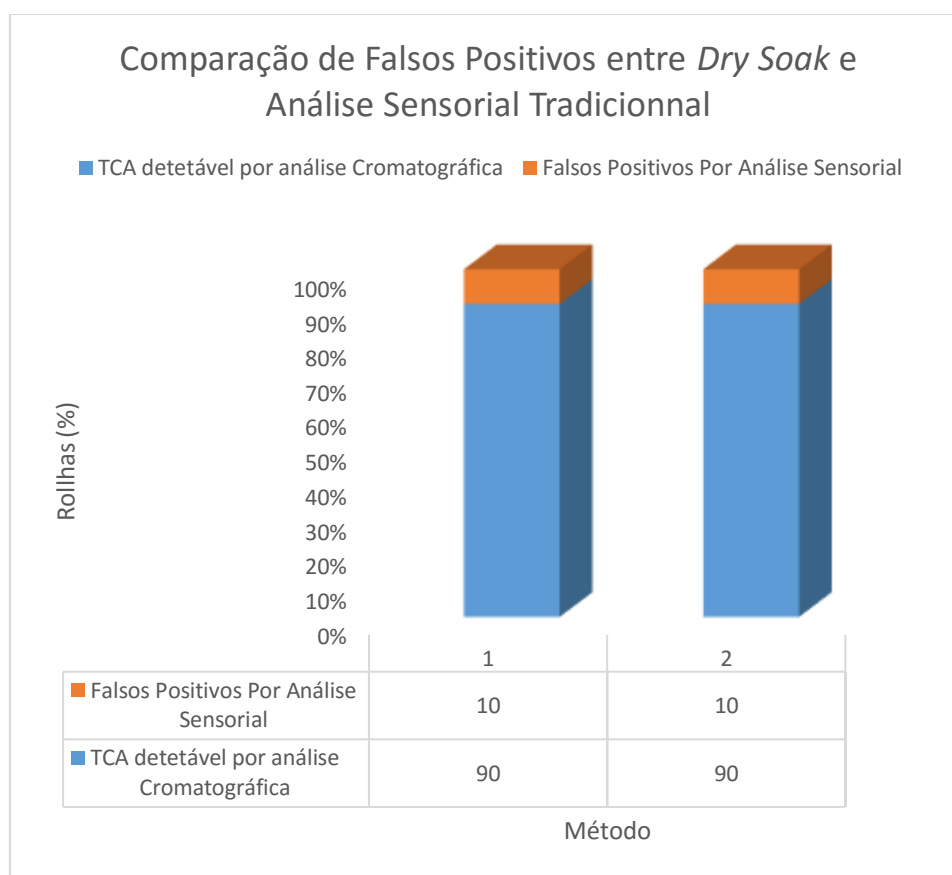
Outro facto observado, foi a deteção de 2 falsos positivos. Conforme já explicado anteriormente, para concentrações mais baixas de TCA, este composto pode ser facilmente confundido olfativamente com outros *off-lavours* semelhantes. Deste modo, poderão surgir falsos positivos. Contudo, 2 amostras como falsos positivos em 20, poderá se considerar que o método é viável para a deteção de TCA, em especial para

concentrações acima de 1,5 ng/L, valor de referência da empresa para a rejeição de rolhas com TCA.

De seguida, comparou-se os dois métodos sensoriais quanto à presença de falsos positivos.

### 4.3.3 Falsos Positivos

Para se poder avaliar o método sensorial *Dry Soak* e a sua eficácia face ao método tradicional, comparou-se a percentagem de falsos positivos deste método, com o método de análise sensorial tradicional. Os resultados apresentam-se na [Figura 24](#).



**Figura 24** - Gráfico de barras que representa a percentagem de amostras com TCA detetável e TCA considerado Falso positivo para o método *Dry Soak* (1) e Análise Sensorial Tradicional (2).

Conforme se pode observar, para ambos os métodos sensoriais verifica-se a presença de 10% de falsos positivos. Ou seja, poderá se considerar o método *Dry Soak*, como um método de deteção de TCA semelhante ao método tradicional quanto à presença

de falsos positivos. Também se verificou que o operador classificou corretamente 90% das rolhas consideradas como positivo em TCA detetadas por análise sensorial em ambos os métodos.

Deste modo, poderá se classificar a análise sensorial pelo método *Dry Soak* com uma eficácia sensorial semelhante ao método tradicional.

#### 4.4 Avaliação do processo Super Rosa por *Dry Soak*

Para se efetuar o controlo do processo, recorreu-se ao seguinte procedimento experimental:

No procedimento do método Super Rosa, colocam-se as rolhas a analisar num saco fechado. De seguida, regula-se a temperatura do ensaio para 50°C injetando-se uma corrente de vapor de água. Posteriormente, seca-se as amostras no reservatório à mesma temperatura. Todo o procedimento tem uma duração de 56 horas.

De seguida, realizou-se *Dry Soak* a cada amostra de rolhas antes e após processo. Sendo os positivos enviados para a análise cromatográfica.

No decorrer do projeto, propôs-se o desafio de avaliar o método de extração de voláteis, denominado Super Rosa. Os resultados obtidos na análise sensorial por *Dry Soak* estão apresentados na Tabela 13, na qual estão detalhadas informações do número de rolhas com TCA detetado por amostra do lote a examinar. A concentração de TCA apresentado corresponde à média de todas as rolhas contaminadas para cada amostra.

**Tabela 13** Resultados Sensoriais e Cromatográficos de rolhas contaminadas antes do processo Super Rosa

Amostra	Quantidade de Rolhas analisadas	Nº Rolhas com TCA	% Rolhas com TCA	Número de rolhas com <i>Off-Lavours</i>	% Rolhas com <i>off-lavours</i>	Total de Defeitos Sensoriais	% Total de Defeitos Sensoriais	TCA médio I&D (ng/L)
1	1440	6	0,4	12	0,8	18	1,3	7,1
2	1440	6	0,4	12	0,8	18	1,3	17,3
3	1000	3	0,3	12	1,2	15	1,5	9,2
4	432	0	0,0	9	2,1	9	2,1	nd
5	864	3	0,3	6	0,7	9	1,0	11,8
6	720	3	0,4	12	1,7	15	2,1	9,3
7	720	6	0,8	0	0,0	6	0,8	17,3
8	720	15	2,1	6	0,8	21	2,9	7,9
9	360	0	0,0	0	0,0	0	0,0	nd
10	360	0	0,0	0	0,0	0	0,0	nd
11	360	6	1,7	0	0,0	6	1,7	7,9
12	360	4	1,1	1	0,3	5	1,4	11,6
13	360	6	1,7	0	0,0	6	1,7	147,3
14	360	6	1,7	0	0,0	6	1,7	45,7
15	360	6	1,7	0	0,0	6	1,7	54,2
16	360	6	1,7	0	0,0	6	1,7	9,6

\*Calibre 45x24 mm e classe 2º proveniente do mesmo lote.

Ao analisar a tabela, pode-se dividir em 3 partes. As primeiras 3 amostras, correspondem a amostras com uma maior quantidade de rolhas (acima de 1000 rolhas) a analisar, a segunda parte, corresponde a amostras com uma quantidade inferior a 1000 rolhas e maior que 360 rolhas, e a terceira parte, uma amostra mais pequena de 360 rolhas correspondendo às amostras de 9 a 16.

De acordo com os dados obtidos, a percentagem de rolhas detetadas sensorialmente como positivo de TCA é menor para as amostras maiores (amostras 1,2 e 3). Para as amostras 1,2 e 3, detetou-se 0,4% de rolhas positivas de TCA para a primeira e segunda amostras, e 0,3% para a terceira. No que diz respeito a outros *off-lavours*, detetou-se 0,8% de rolhas na primeira e segunda amostras e 1,2% na terceira amostra.

Nas amostras do número 4 a 8, a percentagem de rolhas com TCA detetadas sensorialmente varia entre 0,0% e 2,1%, não tendo sido detetada qualquer rolha com TCA na amostra 4. Quanto aos *off-lavours*, verificou-se a sua presença em percentagens que



variam desde 0% ou não detetável, na amostra 7, até obter-se percentagens de rejeição de 2,9% na amostra 8.

Para as amostras que vão do número 9 a 16, observa-se uma extração sensorial de rolhas com TCA que se situa nos 1,7% para as amostras 11,13,14,15 e 16, 1,1% para a amostra 12 e 0% para a 10. No que diz respeito a outros *off-lavours*, verifica-se que apenas a amostra 12 apresenta 0,3 % de *off-lavours*

Quanto ao TCA, nas amostras mais pequenas, obteve-se concentrações de TCA elevadas como são o exemplo das amostras 13 a 15.

Em suma, verifica-se que em amostras mais pequenas se extrai sensorialmente uma quantidade maior de rolhas contaminadas com TCA. Este fenómeno poderá suceder devido à amostra ser mais pequena e poder ser analisada num menor período de tempo, tornando-se menos moroso para o analista a efetuar o ensaio.

De seguida, decidiu-se enviar as mesmas amostras para o processo Super Rosa, no qual se espera uma extração de componentes voláteis da rolha. Na Tabela 14, encontram-se os resultados resumidos após a passagem das rolhas pelo processo.

Para avaliar o estudo, os positivos de TCA foram enviados para o laboratório para a determinação do TCA

**Tabela 14** Resultados da análise Sensorial e Cromatográfica de rolhas contaminadas após o processo Super Rosa

Amostra	Quantidade de Rolhas Analisadas	Nº Rolhas com TCA	% Rolhas com TCA	Número de rolhas com Off-Lavours	% Rolhas com Off-Lavours	Total de Defeitos Sensoriais	% Total de Defeitos Sensoriais	TCA I&D médio (ng/L)	% Melhoria Após Super Rosa
1a	1440	3	0,2	10	0,7	13	0,9	3,9	45,1
2a	1440	6	0,4	6	0,4	12	0,8	10,3	40,5
3a	1000	2	0,2	10	1,0	10	1,0	5,3	42,4
4a	432	0	0,0	0	0,0	0	0,0	nd	---
5a	864	3	0,3	0	0,0	0	0,0	5,8	50,8
6a	720	2	0,3	2	0,3	4	0,6	4,7	49,5
7a	720	4	0,6	0	0,0	4	0,6	8,0	53,8
8a	720	14	1,9	1	0,1	15	2,1	3,9	50,6
9a	360	0	0,0	0	0,0	0	0,0	nd	---
10a	360	0	0,00	0	0,0	0	0,0	nd	---
11a	360	6	1,7	0	0,0	6	1,7	2,6	67,1
12a	360	3	0,8	0	0,0	3	0,8	1,6	86,2
13a	360	6	1,7	0	0,0	6	1,7	52,1	64,6
14a	360	6	1,7	0	0,0	6	1,7	3,2	93,0
15a	360	18	5,0	0	0,0	0	0,0	7,8	85,6
16a	360	6	2,2	0	0,0	0	0,0	2,2	77,1

Na tabela, pode-se observar na amostra 1, uma redução da percentagem de rolhas com TCA para metade, depois das rolhas terem passado pelo processo Super Rosa. Quanto aos *off-lavours*, verificou-se também uma melhoria, reduzindo de 0,8% para 0,7% de rolhas com outros *off-lavours*, bem como a sua intensidade que sensorialmente diminuiu para odores mais ligeiros. No caso do TCA, obteve-se uma eficácia na redução da sua concentração em cerca de 45%, resultando num valor médio final de 3,9 ng/L.

Para a amostra 2, não se verificou uma redução da percentagem de rolhas com TCA, todavia a percentagem de rolhas com outros *off-lavours* diminuiu para metade das rolhas antes de processadas, resultando em 0,4% de rolhas contaminadas. A concentração de TCA obtido após processo foi de 10,3 ng/L, resultando numa melhoria de cerca de 40%, face ao valor anteriormente obtido.

Quanto à amostra 3, verificou-se uma melhoria na percentagem de rolhas contaminadas, obtendo-se apenas 0,2% face aos 0,3% contaminadas anteriormente ao processo. A melhoria foi também observada no caso de outros *off-lavours*, tendo-se reduzido de 1,2% para 1,0%. Após Super Rosa, o resultado da concentração de TCA média foi de 5,3 ng/L, representando uma melhoria de cerca de 42%.

No caso da amostra 4, após o processo, a amostra reduziu em 2,1% a percentagem de rolhas com outros *off-lavours*, obtendo-se deste modo uma amostra limpa.

Para a amostra 5, verificou-se uma melhoria de cerca de 51% na concentração de TCA e eliminação por completo de rolhas contaminadas com outros *off-lavours*. A percentagem de rolhas contaminadas manteve-se nesta amostra, contudo a sua concentração de TCA no final do processo diminuiu para 5,8 ng/L.

No que diz respeito à amostra 6, verificou-se uma redução da percentagem de rolhas contaminadas com TCA para 0,3% e uma concentração de 4,7 ng/L representando uma melhoria efetiva que se aproxima dos 50% para a concentração de TCA. A percentagem de rolhas contaminadas com outros *off-lavours* foi de 1,7% para 0,6%.

Para a amostra 7, observa-se uma redução da percentagem de rolhas com TCA para 0,6%, denotando-se uma melhoria de quase 54% na concentração de TCA que foi reduzida para o valor de 8,0 ng/L.

Quanto a amostra 8, verifica-se uma melhoria na percentagem de rolhas contaminadas por de 2,1% para 1,9% e uma extração de *off-lavours* de 0,8% para 0,1%. Quanto à concentração, de TCA o processo revelou uma eficácia de cerca de 51%. A concentração final de TCA, após processo, foi de 3,9 ng/L.

As amostras 9 e 10, revelaram sensorialmente limpas, mesmo após o processo Super Rosa. Após a amostra 10, o processo Super Rosa, foi otimizado no que diz respeito à temperatura de secagem, tempo de reação e estabilização.

Para a amostra 11, observou-se que a otimização do processo, revelou uma eficácia na redução do volátil TCA para uma concentração de 2,6 ng/L, obtendo-se uma melhoria de 67% sensivelmente.

No que diz respeito à amostra 12, a melhoria foi ainda maior obtendo-se uma concentração de TCA de 1,6 ng/L e uma eficácia de mais de 86%. Também se verificou

que a amostra ficou limpa de *Off-lavours* e uma redução da percentagem de rolhas contaminadas com TCA de 1,1% para 0,8%.

Quanto à amostra 13, observou-se uma melhoria que ronda os 65%, a concentração do volátil TCA é de, 56,7 ng/L.

A amostra 14 também obteve-se uma melhoria dos resultados de TCA, obtendo-se uma concentração de TCA final de 3,2 ng/L e uma eficácia na extração de TCA de 93%, a maior eficiência detetada neste estudo.

Para a amostra 15, verificou-se uma eficácia de extração de TCA de cerca de 86% e uma concentração final de 7,8 ng/L. Contudo, detetou-se uma maior percentagem de rolhas positivas de TCA (5%) durante o sensorial, pelo que se decidiu tentar perceber as causas deste pico detetado.

Para se detetar uma eventual contaminação ou falha sensorial, decidiu-se recorrer ao instrumento MEDCORK, no qual se realizaram estudos de humidade a amostras do lote antes e após processo.

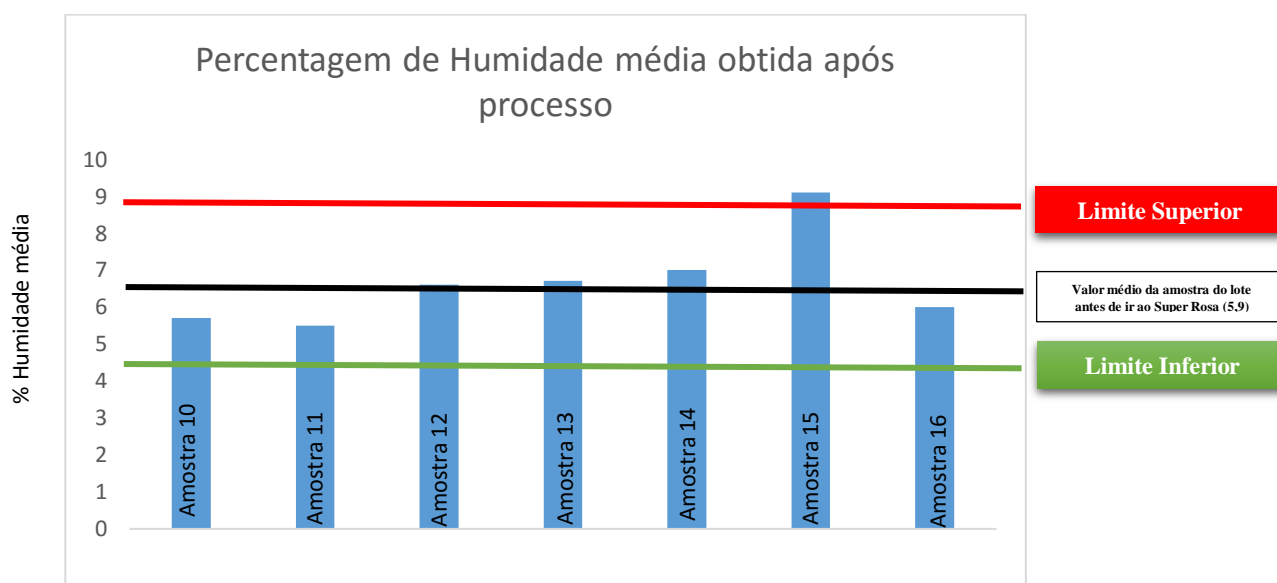
#### **4.5 Estudos da percentagem de Humidade nas amostras de rolhas após Super Rosa**

Para o estudo, utilizou-se o equipamento denominado MedCork, no qual se inserem 20 rolhas numeradas de 1 a 20 realizando-se medições de massa, densidade, dimensões e humidade. O equipamento é apresentado na Figura 25.



**Figura 25** - Equipamento MedCork

Os resultados obtidos encontram-se no Figura 26, apresentados como carta com os valores de humidade para as sete diferentes amostras. A preto, destaca-se o valor médio de humidade das amostras antes do processo Super Rosa. A vermelho, destaca-se o limite superior estabelecido pela empresa e a verde o limite inferior



**Figura 26** – Estudo da Percentagem de Humidade obtida para as amostras numeradas de 10 a 16 após processo Super Rosa

Conforme se pode visualizar, a amostra 15 contém uma humidade média de 9,1% encontrando-se fora do limite superior de especificação. Este fenómeno pode ocorrer, devido a que no processo se utilize vapor de água, este condense em alguns locais e ocorra

o fenómeno de lixiviação, que por vezes não permite a secagem eficiente das rolhas na fase final do processo.

Na amostra 16, pode-se verificar uma melhoria de sensivelmente 77% e uma concentração de TCA de 2,2 ng/L.

Como conclusões finais, pode-se observar que a redução da concentração de TCA é mais eficiente em concentrações de TCA não críticas, ou seja, com uma concentração de TCA abaixo de 20,0 ng/L. Quando se observa uma concentração de TCA moderada de sensivelmente 10,0 ng/L, existiram rolhas que atingiram valores abaixo do limite estabelecido pela Amorim & Irmãos de 1,5 ng/L, ou seja passaram ao estado de acordo com o critério. Observou-se também, que após a otimização do processo Super Rosa, os resultados foram melhores face aos denotados até à amostra 9.

#### **4.6 Otimização do método Super Rosa utilizando diferentes solventes**

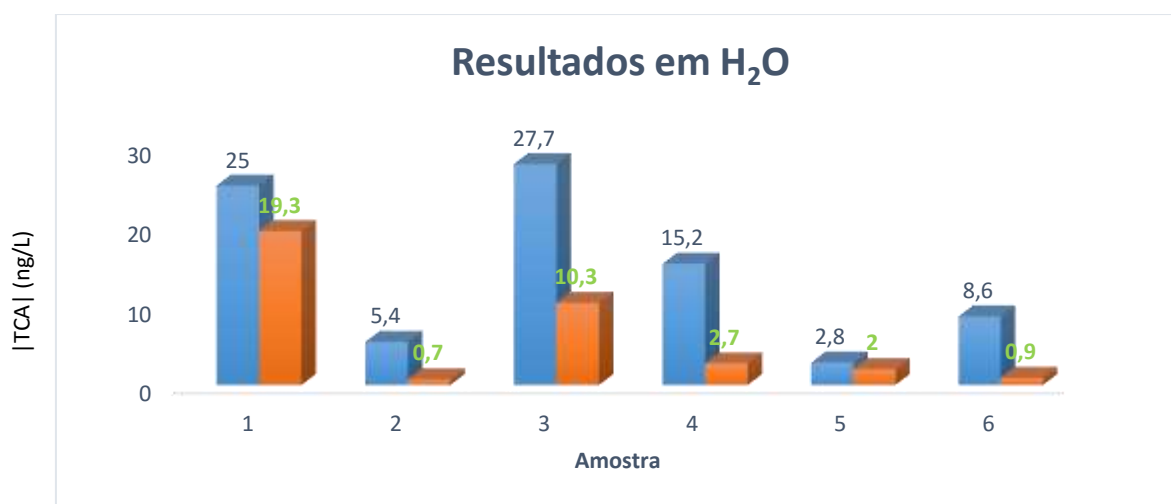
No decorrer do projeto, decidiu-se implementar melhorias na extração de voláteis pelo método Super Rosa. Nesse sentido, preparou-se soluções de 2-propanol da marca Sigma-Aldrich com pureza de 99,5%, etanol da Merck com 99,9% de pureza e propanona da Merck com pureza de 99,8%. Para se preparar as soluções, utilizou-se um balão volumétrico de 100,0 ml e pipetas volumétricas de 5,00, 10,00, 20,00 e 50,00 ml de acordo com a concentração desejada. De seguida, vazou-se o conteúdo do balão volumétrico para um matraz de 250,0 ml, no qual se suspende uma rolha com a ajuda de um arame anti-oxidante, selando-se de seguida o matraz com película flexível.

Por fim, coloca-se o matraz na estufa da marca SPLABOR e modelo SP-102 num período de 6 horas.

No seguimento do processo Super Rosa, decidiu-se estudar o efeito da utilização de solução hidroalcoólica a 12% no processo. Testaram-se outros reagentes como, 2-Propanol e Propanona, mas devido aos seus resultados pouco eficientes e a natureza económica destes reagentes, decidiu-se tentar aplicar melhorias ao processo nas alternativas que não comprometam a economia do processo, assim decidiu-se apresentar os resultados obtidos para o método Super Rosa em solução hidroalcoólica.

Em primeiro lugar, decidiu-se realizar o processo em microescala de acordo com as condições. Assim, utilizou-se água destilada em tempos de 12 horas (6 horas de remoção de voláteis e 6 horas de secagem), ao invés das 56 horas utilizada à escala industrial. A temperatura utilizada foi de 50°C.

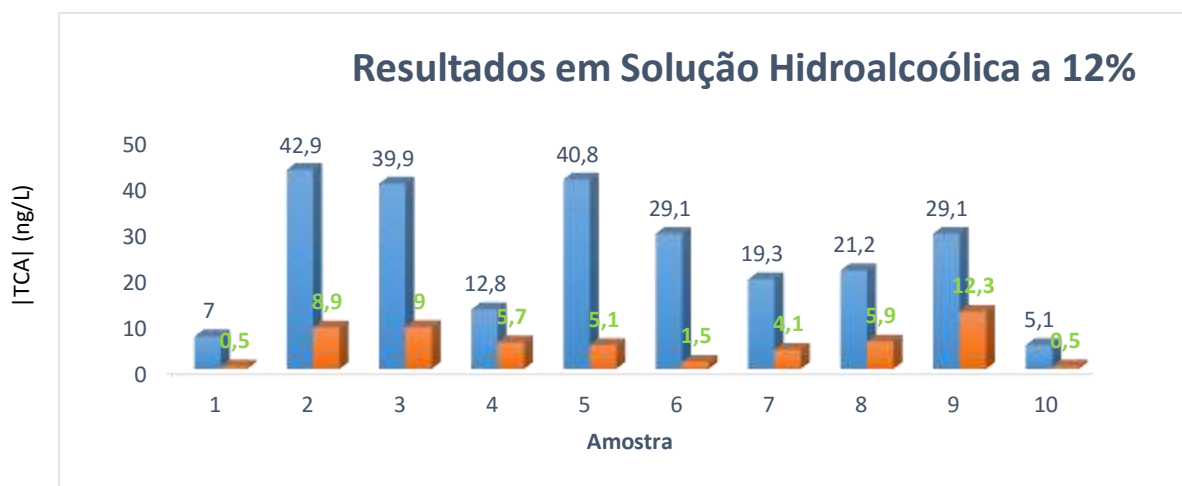
Os resultados apresentam-se na Figura 27 relacionado a concentração de TCA com 6 amostras analisadas.



**Figura 27** – Resultados do Processo Super Rosa utilizando H<sub>2</sub>O

Pode-se observar que há uma eficiência na remoção de TCA da rolha. Em termos globais, para esta solução, obteve-se uma eficácia de 63%.

No Figura 28 pode-se observar o mesmo processo mas para rolhas utilizando solução hidroalcoólica 12% em 10 amostras antes e após processo.



**Figura 28** - Resultados do Processo Super Rosa utilizando solução hidroalcoólica a 12 %

Os resultados permitem observar que há uma maior eficiência na extração de TCA, devido à afinidade que o TCA apresenta para o etanol. Deste modo, concentrações de TCA com valores acima de 20,0 ng/L, podem ser minimizados para valores abaixo do critério de referência de 1,5 ng/l, ou para concentrações de TCA significativamente mais reduzidas. A eficácia utilizando este extrator de TCA é de 79%, verificando-se uma melhoria face ao mesmo processo utilizando H<sub>2</sub>O, em especial para concentrações de TCA mais acima dos 20,0 ng/L.

Deste modo, espera-se que no futuro se realizem testes no processo Super Rosa, de forma a verificar-se se o valor obtido em microescala se observa em macro e se o resultado compensa o investimento económico utilizando no processo uma solução de 12 % de etanol em face de apenas água.





## 5 CONCLUSÃO

Ao longo do trabalho de “implementação de *Dry Soak*”, uma variedade de conclusões permitiram ser obtidas para desenvolvimento do método, validação do método e também para a validação de outros métodos, como foi o caso do método Super Rosa.

### **Estudo da concentração mínima de TCA percecionada pelo método de análise sensorial tradicional para rolhas de cortiça com diferentes lavações**

Em rolhas de lavação Cl0, a concentração de 0,7 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

No que diz respeito às rolhas de lavação Cl2000, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

Outro facto observado, são as concentrações de TCA mais elevadas para as rolhas para o cliente E. O sucedido, deve-se ao pré-requisito do cliente, que define que se coloque as rolhas em solução hidroalcoólica, em vez de água, e num período de 48 horas.

Para a lavação Nova101, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

Em rolhas de lavação *Light*, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

Para o cliente S, as elevadas concentrações de TCA podem ser justificadas pelo pré-requisito do cliente de se cortar as rolhas, 24 horas antes de se efetuar análise sensorial às rolhas.

Quanto à lavação CI2000C, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”

Para a lavação *Nature*, a concentração de 0,9 ng/L foi o valor mínimo percecionado sensorialmente. Este valor é inferior a 1,5 ng/L, valor de referência estabelecido pela empresa, como critério de rejeição de um lote para assegurar que a rolha não contamine o vinho com “gosto de rolha”.

### **Controlo do método de análise sensorial tradicional por comparação com o método da análise cromatográfica**

Neste estudo, verificou-se que a presença de falsos positivos encontra-se nos níveis de TCA mais baixos (nível 1 e 2). No que diz respeito ao nível 1, como estão presentes concentrações de TCA entre 0,5 e 1,5 ng/L dar origem a uma percentagem de erro, já que a perceção sensorial de TCA mais baixa detetada pelo operador foi de 0,7 ng/L e poderá ter uma maior incerteza sensorial associada devido à presença também de outros *off-lavours* muito semelhantes sensorialmente, como é o caso do Tetracloroanisol e Pentacloroanisol, que poderão ser confundidos em concentrações baixas de TCA que se encontram no nível 1.

Quanto ao nível 2, poderá passar-se a mesma situação, uma vez que o nível 2 engloba um intervalo de valores de 1,5 ng/L a 5,0 ng/L, possuindo concentrações de TCA abaixo de 2,0 ng/L que se considera um valor com maior probabilidade de erro, pois a 1,5 ng/L a concentração de TCA não seja muito “clara” sensorialmente, podendo assemelhar-se a outros *off-lavours* como bolores e mofos, como Tetracloroanisol e Pentacloroanisol.

Para os restantes níveis, não se observou a presença de falsos positivos, uma vez que a partir de concentrações de TCA entre 4,5 e 5,0 ng/L, o TCA é de fácil deteção para provadores treinados para análise sensorial de rolhas de cortiça, sendo quase nula a percentagem de erro.

### **Controlo do método *Dry Soak***

No controlo do método, através da carta de controlo e comparação dos resultados pelo método sensorial tradicional, verificou-se que a concentração mínima de TCA

percecionada sensorialmente pelo método *Dry Soak*, foi de 0,7 ng/L e pelo método tradicional 0,9 ng/L, sendo percepções sensoriais muito semelhantes para as 20 amostras. Conforme se pôde observar, apesar da heterogeneidade, os pontos encontram-se mais concentrados no nível 3 de TCA, com 9 pontos presentes neste intervalo de [5;10 ng/L]. Observou-se que as amostras apresentam concentrações de TCA nos restantes níveis, podendo indicar que o método *Dry Soak* deteta rolhas com TCA positivo nos 4 níveis de TCA.

Outro facto observado foi a deteção de 2 falsos positivos. Conforme já explicado anteriormente, para concentrações mais baixas de TCA, este composto pode ser facilmente confundido olfativamente com outros *off-lavours* semelhantes. Deste modo, poderão surgir falsos positivos. Contudo, 2 amostras como falsos positivos em 20, poderá se considerar que o método é viável para a deteção de TCA, em especial para concentrações acima de 1,5 ng/L, valor de referência da empresa para a rejeição de rolhas com TCA ng/L para o cliente, lavação e calibre em questão.

Comparando o método sensorial tradicional ao *Dry Soak*, verificou-se 90% de rolhas com TCA detetável e 10% de falsos positivos, verificando-se deste modo, que os métodos se assemelham no que diz respeito a este parâmetro, podendo ambos ser classificados como viáveis na deteção de TCA olfativamente.

### **Avaliação do processo Super Rosa por Dry Soak**

Neste passo, apurou-se que o método Super Rosa é um método eficaz na extração de componentes voláteis, verificando-se uma eficácia de 60% numa primeira fase do processo e uma eficácia de 80% na segunda fase. Comprovando sensorial e cromatograficamente, o sucesso deste processo na remoção dos diferentes *off-lavours*, em especial do TCA.

### **Estudo de Otimização do Processo Super Rosa**

Ao otimizar-se o método Super Rosa em escala laboratorial, verificou-se que para a solução hidroalcoólica há uma eficiência de extração de TCA face ao mesmo processo em água. Obtendo-se perdas significativas na concentração de TCA, como 63% de extração de TCA para o caso do vapor de água e 79% para a solução hidroalcoólica.



## 6 BIBLIOGRAFIA

- [1] Manual de Acolhimento Amorim & Irmãos;
- [2] Silva S.P., Sabino M., E. Fernandes M., V. M. Correlo, L. F. Boes e R. L. Reis, “*Cork: properties, capabilities and applications*”, International Materials Reviews, 2005, 50(6), 345-365;
- [3] Magri D., Fineschi S., Bellarosa R., Buonamici A., Sebastiani F., Schirone B., Simeone M. C. e. Vendramin G, “*Blackwell Publishing Ltd The distribution of Quercus suber chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean*”, Molecular Ecology, 2007, 16, 5259 – 5266;
- [4] Leal. S., Nunes E., Pereira H., “*Cork oak (Quercus suber L.) wood growth and vessel characteristics variations in relation to climate and cork harvesting*”, Journal Forest Res, 2008, 127, 33–41;
- [5] Graça J., “*Os tipos de cortiça e os produtos da sua transformação industrial*”, Departamento de Engenharia Florestal, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 2002;
- [6] Hooke R., Micrographia, The Royal Society, London, 1664; 112-121;
- [7] Lorna J.G., “*Biomechanics of celular solids*”, J. Biomech., 2005, 38(3); 377-399;
- [8] A. Lagorce-Tachona, Thomas Karbowiaka, Dominique Championa, Régis D. Gougeona, Jean-Pierre Bella, “*Mechanical properties of cork: Effect of hydration*”, 82, 2015, 148–154;
- [9] Brugnatelli D., “*Elimenti di chimica*”, Tomo II, 1787;
- [10] Chevreul M., De l’action de l’acide nitrique sur le liège”, Ann. Chim., 1807, 92, 323-333;
- [11] Pereira H. “*Cork: biology, production and uses*”, Elsevier Publications, 2007, ,3, 103-109;
- [12] Santos S., Cabral V., Graça J. “*Cork Suberin Molecular Structure: Stereochemistry of the C18 Epoxy and vic-Diol  $\omega$ -Hydroxyacids and  $\alpha,\omega$ -Diacids Analyzed by NMR*” Journal of Agricultural Food Chemistry, 2013, 61 (29), 7038–7047;
- [13] Graça J. e Santos S, Suberin : A Biopolyester of Plants Skin, Macromol, Biosci., 2007, 7(2), 128-135
- [14] Bernards Mark A, “*Demystifying suberin*”, Canadian Journal of Botany, 2002, 80(3): 227-240;
- [15] Marques A. V. , Pereira. H, D. Meier, O. Faix, “*Quantitative Analysis of Cork (Quercus suber L.) and Milled Cork Lignin by FTIR Spectroscopy, Analytical Pyrolysis, and Total Hydrolysis*”, Holzforschung, 1994, 48, 43-50;
- [16] Watkins D., Nuruddin M., Hosur M., Tcherbi-Narteh A., Shaik Jeelani S., “*Extraction and characterization of lignin from different biomass resources*”, mater res technol ., 2015, 4(1), 26–32;
- [17] Jorgensen H., Kristensen JB e Felby C., “*Enzimatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities*”, Biofuel Bioprod. Bior, 2007, 1, 119-134;
- [18] Sousa A. , Pinto P. , A. J. D. Silvestre , N. Carlos “*Triterpenic and Other Lipophilic Components from Industrial Cork Byproducts*”, Journal Agricultural Food Chemistry, 2006, 54 (18), pp 6888–6893;

- [19] A.O. Santos Sónia, C.R.O. Pinto Paula, J.D. Silvestre Armando, P. N. Carlos, “*Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from Quercus suber L.*”, Industrial Crops and Products, 31, 3, 2010, 521–526;
- [20] APCOR, “*Cortiça: Os factos*”. Conrk Information Bureau 2004, 4-7;
- [21] Sefton Mark A. e Simpson Robert F, “*Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine*”, Australian Journal of Grape and Wine, 2005, Research, 11, 2, 226–240;
- [22] – Coque, Álvarez-Rodríguez M., Larriba G., “*Characterization of an Inducible Chlorophenol O-Methyltransferase from Trichoderma longibrachiatum Involved in the Formation of Chloroanisoles and Determination of Its Role in Cork Taint of Wines*”, applied and environmental microbiology, 2003, (69), 9, 5089–5095
- [23] Buser H., Zanier C., Tanner H., “*Identification of 2,4,6-Trichloroanisole as a Potent Compound Causing Cork Taint in Wine*”, J. Agric. Food Chem. 1982, 30, 359-302
- [24] Álvarez-Rodríguez M., López-Ocaña L., Coronado J., Rodríguez E., Martínez M. J., Larriba G., and Juan-José R. Coque, “*Cork Taint of Wines: Role of the Filamentous Fungi Isolated from Cork in the Formation of 2,4,6-Trichloroanisole by O Methylation of 2,4,6-Trichlorophenol*”, applied and environmental microbiology, 2002, (68),12, 5860–5869
- [25] Coque, J. J. R., Pérez, E. R., Goswami, M., Martínez, R. F., García, S. C., Rodríguez, M. L. A., e Martín, J. F. M.. “*Contaminação do vinho por haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis*”, 2006, INBIOTEC,.1-66.
- [26] CTCOR, Manual da Análise Sensorial, 2015;
- [27] Macku C., Gonzalez L., Schleusner C., Mesquita A.C., Herwatt J.W., Kirch L. C., Schwartz R., “*Sensory Screening for Large-Format Natural Corks by “Dry Soak” Testing and Its Correlation to Headspace Solid-Phase Microextraction (SPME) Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Releasable*”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57, 7962;
- [28] Valente A., e Augusto F. , “*SPME solid phase micro-extraction. Fundamental aspects of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) are discussed in the present paper. The application of SPME as a microtechnique of sample preparation for gas chromatographic analysis is considered and related to existing theoretical models. Both research prototypes and commercial SPME devices are considered*”, QUÍMICA NOVA, 2000, 23(4),523-530;
- [29] Shishir T., Satyendra K., N. K. Sand, “*Development and Validation of GC-ECD Method for the Determination of Metamitron in Soil*”, International Journal of Analytical Chemistry, 2015,2015,1-5
- [30] Marek T., Namieśnik J., “*Determination of chlorinated solvents in industrial water and wastewater by DAI–GC–ECD*”, Anal Bioanal Chem., 2011, 399(10): 3565–3572.
- [31] <http://image.slidesharecdn.com/gc-mpharmsud-130408055024-phpapp02/95/gc-mpharm-sud-38-638.jpg?cb=1365400329>, acedido a 25/03/2016
- [32] Sloan, K. M.; Mustacich, R. V.; Eckenrode, B. A. “*Development and evaluation of a low thermal mass gas chromatograph for rapid forensic GC-MS analyses*”. Field Analytical Chemistry & Technology, 2001, 5 (6): 288–301;
- [33] Patterson, G. E.; Guymon, A. J.; Riter, L. S.; Everly, M.; Griep-Raming, J.; Laughlin, B. C.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. (2002). “*Miniature Cylindrical Ion Trap Mass Spectrometer*”. Analytical Chemistry 74 (24): 6145–6153;
- [34] “*Amorim lança NDTech, com garantia total contra o sabor a rolha*”, Expresso, acedido a 21/05/2016;
- [35] Cabral M., “*Cork Product Treatment System and Apparatuses by Extraction of Compounds of Dragged in Water Vapour*”, 2004 acedido a 28/03/2016;

[36] Pereira C. e Gil L., “*O Problema do Odor a Mofo nas Rolhas de Cortiça e Processos para a sua Redução/Eliminação*”, Silva Lusitana, 2006,14(1): 101 – 111;